ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحه ۲۳ - ۱۳

بیان سلولاز *CMC3* تحت کنترل راه‌اندازهای متانل اکسیداز و الکل اکسیداز در مخمر *Pichia pastoris*

The expression of cellulase *CMC3* under control the alcohol oxidase 1 (AOX1) and methanol oxidase (MOX) promoters in the yeast *Pichia pastoris*

محسن ممبنی[۱]، ساره ارجمند[۲]، سید امید رعنایی‌سیادت[۲]، علیرضا عباسی[۱]، هوشنگ علیزاده[*۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲- به‌ترتیب استادیار، دانشیار، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، پردیس عمومی، تهران

Mombeni M[1], Arjmand S[2], Ranaei Siyadat SO[2], Abbasi A[1], Alizadeh H[*1]

1- PhD Student, Associate Professors, Department of Agricultural and Natural Resources Biotechnology, University of Tehran, Iran, Karaj
2- Assistant Professor, Associate Professor, Protein Research Center, University of Shahid Beheshti, GC, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

راه‌اندازهای کوتاه و قدرتمند از اجزای کلیدی بیان موفق پروتئین نوترکیب در میزبان‌های مختلف از جمله مخمر *Pichia pastoris* می‌باشند. در این مطالعه بیان خارج سلولی آنزیم سلولاز بتااندوگلوکاناز (CMC3) تحت کنترل راه‌انداز متانول‌اکسیداز (MOX) و الکل‌اکسیداز ۱ (AOX1) با تحت خوراک‌دهی متانول مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور حذف اثر تعداد کپی، کلون‌های نوترکیب حاوی یک نسخه جای‌گیری در ژنوم با استفاده از روش Real-Time PCR شناسایی و مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم، زایموگرافی و SDS-PAGE بیان قدرتمند و قابل مقایسه سلولاز تحت کنترل هر دو راه‌انداز MOX و AOX1 در این مخمر را نشان دادند. نتایج بیان قوی CMC3 نشان داد که راه‌انداز کوتاه MOX می‌تواند با موفقیت برای تولید پروتئین نوترکیب با بیان بالا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی
پروتئین نوترکیب
سلولاز
راه‌انداز
Pichia pastoris

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

مقدمه

مخمرهای متیل‌دوستی[1] مانند *Candida biodinii*، *Hansenula polymorpha*، *Pichia methanolica* و *Pichia pastoris* برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب به‌کار برده شده‌اند (Gellissen 2000; Mattanovich et al. 2012). پرکاربردترین مخمر متیل‌دوست *P. pastoris* است و تاکنون بیش از صدها پروتئین در آن بیان شده‌اند (Vogl and Glieder 2013). یکی از مهم‌ترین خصوصیات این مخمر و سایر مخمرهای متیل‌دوست وجود راه‌اندازهای قدرتمندی است که به‌وسیله متانول القا می‌شوند که از ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسم متانول[2] (MUT) جداسازی شده‌اند (Gasser et al. 2015). مخمر *P. pastoris* دارای دو نسخه از ژن الکل‌اکسیداز- آنزیم کلیدی متابولیسم متانول- بنام *AOX1* و *AOX2* است که این دو نسخه از نظر قدرت راه‌اندازی متفاوت هستند (Cregg et al. 1989). قدرت راه‌اندازی بالا و تنظیم دقیق (القای شدید توسط متانول و مهار فعالیت راه‌اندازی با سایر منابع هیدروکربنی مانند گلوکز و گلیسرول) مهم‌ترین خصوصیت راه‌انداز AOX1 است که باعث شده‌است این راه‌انداز پرکاربردترین راه‌انداز برای تولید پروتئین نوترکیب در این مخمر باشد (Jahic et al. 2006). در مطالعات مختلف بیان پروتئین با مقدار بیش از ۲۲ گرم در لیتر به‌صورت درون سلولی و ۱۵ گرم در لیتر به‌صورت خارج سلولی تحت کنترل این راه‌انداز گزارش شده‌است (Hasslacher et al. 1997; Werten et al. 1999). علی‌رغم خصوصیات مثبت ذکر شده، طول بزرگ این راه‌انداز (۹۳۹ باز) باعث بروز برخی چالش‌ها در بیان پروتئین نوترکیب می‌شود چرا که با افزایش طول راه‌انداز محل‌های بالقوه اتصال آنزیم‌های برشی افزایش می‌یابد. این موضوع منجر به ایجاد محدودیت‌هایی در همسانه‌سازی ژن‌ها می‌شود. در کنار این مشکل، کار کردن با راه‌اندازهای بلند به‌خصوص در زیست شناسی صناعی[3] باعث بروز محدودیت‌هایی در طراحی و نیز طول حامل[4] می‌شود. با توجه به مشکلات ذکر شده یکی از محورهای بهبود مخمر *P. pastoris* جهت بیان پروتئین نوترکیب و استفاده در زیست‌شناسی صناعی توسعه سیستم‌های بیانی جدید مبتنی بر راه‌اندازهای کوچک و قدرتمند است (Redden and Alper 2015).

شباهت در مسیر متابولیسم متانول بین مخمر *P. pastoris* و سایر مخمرهای متیل‌دوست می‌تواند به‌عنوان یک منبع جدید برای شناسایی و به‌کارگیری راه‌اندازهای قدرتمند دارای اهمیت باشد. گزارش شده‌است که شباهت بالایی در مسیر متابولیسم متانول بین مخمرهای *P. pastoris* و *H. polymorpha* وجود دارد (Egli et al. 1982; Tschopp et al. 1987). مطالعه ترانسکریپتوم این مسیر متابولیسمی بیان بالای ژن‌های دخیل در این مسیر به‌خصوص ژن *MOX* را نشان داد (Ravin et al. 2013). MOX یک نسخه از آنزیم هم‌عرض الکل‌اکسیداز می‌باشد و گزارش شده‌است که این آنزیم در مخمر *H. polymorpha* تحت القا با متانول بیش از ۴۰ درصد محتوای پروتئینی سلول را در بر می‌گیرد (Gödecke et al. 1994).

سلولازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند (Sukumaran et al. 2005) که انواع مختلف آن به‌طور موفقیت‌آمیزی در میزبان‌های مختلف از جمله مخمر *P. pastoris* بیان شده‌اند (Chen et al. 2011; Mellitzer et al. 2012). با توجه به نحوه سنجش فعالیت نسبتاً ساده، این آنزیم‌ها در بعضی مطالعات به‌عنوان ژن‌های گزارشگر استفاده شده‌اند (Boonvitthya et al. 2013; Wongwisansri et al. 2013).

در این تحقیق ناحیه راه‌اندازی ژن *MOX* مخمر *H. polymorpha* جهت بررسی کاربرد در بیان پروتئین نوترکیب و مقایسه با راه‌انداز رایج AOX1 در مخمر *P. pastoris* مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور ژن سلولاز بتااندوگلوکاناز *CMC3* مشتق از قارچ *Homicola insolens* به‌عنوان ژن گزارشگر مورد استفاده قرار گرفت و تحت کنترل دو راه‌انداز MOX و AOX1 در مخمر *P. pastoris* بیان شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق سیستم بیانی pPINK-HC™ سویه ۱ (*ade2*) مخمر *P. pastoris* برای بیان ژن گزارشگر *CMC3* و باکتری *E. coli DH5α* جهت تکثیر سازه نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Methylotrophic
[2] Methanol-Utilization Pathway
[3] Synthetic biology
[4] Vector

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

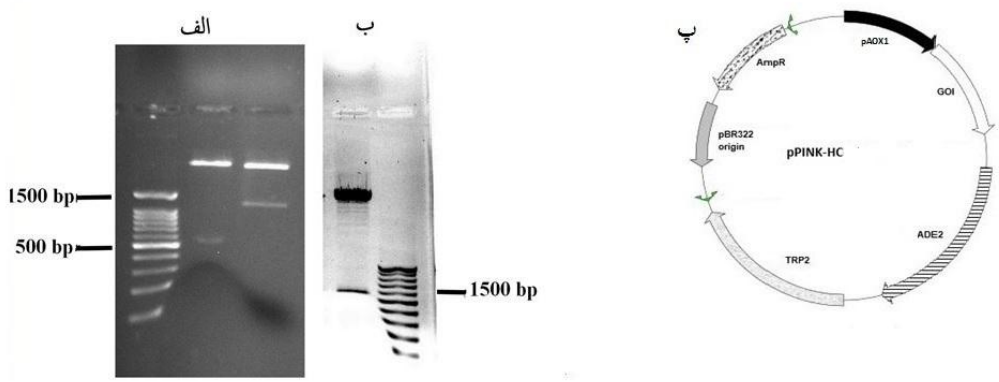
کلیه مواد شیمیایی از شرکت Merck (آلمان) و Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شدند. آنزیم‌های تغییردهنده DNA از شرکت‌های Thermo Fisher Scientific. Inc. (آمریکا) و Takara Bio. Inc. (ژاپن) خریداری شدند. تمام مواد کاربردی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، کیت‌های بازیابی قطعات تکثیری از روی ژل آگارز و کیت‌های استخراج پلاسمید از شرکت Bioneer (کره جنوبی) تامین شدند.

بر اساس توالی ناحیه راه‌اندازی MOX با کد MG976719.1 از پایگاه داده NCBI، یک جفت آغازگر جهت تکثیر این ناحیه از روی ژنوم مخمر *H. polymorpha* به‌همراه نواحی برشی *Bgl*II و *Eco*RI در دو انتهای ′۵ و ′۳ توالی راه‌انداز طراحی شدند. آغازگرها (جدول۱) با استفاده از نرم‌افزار primer 3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) طراحی شدند. محصول PCR و حامل pPINK-HC (شکل ۱) با استفاده از دو آنزیم برشی *Bgl*II / *Eco*RI هضم دوگانه شدند. در نتیجه راه‌انداز AOX1 از حامل خارج و محصول PCR با واکنش الحاق در حضور DNA لیگاز جایگزین شد و نهایتاً سازه pPINK-HC-MOX طراحی شد. ژن سلولاز اندوگلوکاناز *CMC3* (۳۸۸ اسیدآمینه) به‌همراه سیگنال پپتید طبیعی خود و همچنین محل اتصال آنزیم‌های برشی *Kpn*I / *Eco*RI در دو انتهای ′۵ و ′۳ بر اساس ترجیح کدونی مخمر *P. pastoris* در حامل pPINK-HC پیشتر از سوی آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شده بود. ژن سنتز شده و سازه pPINK-HC-MOX با دو آنزیم برشی فوق هضم دوگانه شدند و واکنش الحاق در حضور آنزیم DNA لیگاز صورت پذیرفت. برای طراحی سازه دوم ناقل pPINK-HC حاوی راه‌انداز AOX1، ژن *CMC3* و سازه با استفاده از آنزیم‌های برشی *Kpn*I /*Eco*RI هضم دوگانه شدند و واکنش الحاق *CMC3* به درون سازه در حضور آنزیم DNA لیگاز صورت پذیرفت. مخلوط‌های واکنش الحاق به روش شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های مستعد از پیش تهیه شده *E. coli DH5α* انتقال یافت. کلنی‌های مثبت بر اساس رشد بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و PCR ژن سلولاز و راه‌انداز MOX شناسایی شدند. نیمرخ‌های حرارتی واکنش‌های PCR برای دو ژن شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه با شرایط ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرهای *CMC3* وMOX و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر ژن *CMC3* و ۴۵ ثانیه برای تکثیر ژن MOX و در پایان ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی بود. کلون‌های به‌دست آمده با استفاده از PCR با آغازگرهای اختصاصی راه‌انداز و ژن *CMC3* و همچنین با توالی‌یابی محصولات PCR تایید شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی‌های راه‌انداز MOX، ژن *CMC3* و تشخیص تعداد کپی ژن به روش Real- Time PCR.

آغازگر	نام آغازگر	توالی	طول قطعه تکثیری
تکثیر راه‌انداز MOX	F-MOX	AATTAGATCTCCGGAGGCTGGGCTTTC	۵۴۵
	R-MOX	CGGCCCGAATTCTTTGTTTTTGTATTTAG	
تکثیر ژن *CMC3*	F-cmc3	TAGAAGCTTCAAGGTGGTGCTTGG	۱۲۴۳
	R-cmc3	TTCCGATCCCTACTATGGAACGTATTC	
تشخیص تعداد نسخه ژن بر اساس توالی‌های MOX و *CMC3*	F- mox	TTTAAAGGTTCGGTAGAAATTTGTCCTC	۸۹
	R- mox	GAAACAGCTATGACCATGATTACGC	
	F-cmc3	TGACGGCTTCAACATGTTCC	۱۰۲
	R-cmc3	CTCAGTCAGGTTTCGGAGGT	
	F-ARG4	CTGAGACAAAGTTCACGGGTATC	۱۰۱
	R-ARG4	GATGCTGCTGGAGACGATTC	

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]



شکل ۱- سازه بیانی طراحی شده

الف- تایید سازه بیانی pPINK-HC-MOX-CMC3 به روش هضم آنزیمی. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست شامل نشانگر DNA، هضم ناقل و برش راه‌انداز MOX با طول ۵۳۳ باز و هضم ناقل و برش ژن *CMC3* با طول ۱۲۳۲ باز می‌باشند.

ب- تایید سازه بیانی PINK-HC-AOX1-CMC3 به روش هضم آنزیمی. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست شامل هضم ناقل و برش ژن *CMC3* و نشانگر DNA می‌باشند.

پ- شکل شماتیک ناقل pPINK-HC طراحی شده.

در نهایت کلنی‌های حاوی سازه pPINK-HC-MOX-*CMC3* و pPINK-HC-AOX1-*CMC3* برای مراحل بعدی تحقیق در این باکتری تکثیر شدند. انتقال ناقل به سلول‌های مستعد مخمر (از پیش تهیه شده) بر اساس روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه Electroporator manipulator (BTX ECM630, Harvard apparatus) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت. قبل از انتقال سازه‌های بیانی جهت الحاق به ناحیه لوکوس *TRP2* سویه ۱ با استفاده از آنزیم برشی *SpeI* خطی شدند. کلنی‌های مثبت بر اساس رشد بر روی محیط انتخابی PAD[1] (Invetrogen) انتخاب و با استفاده از واکنش PCR بر اساس آغازگرهای اختصاصی (جدول۱) راه‌انداز MOX و ژن *CMC3* تایید شدند.

محتوای DNA ژنومی مخمرهای *P. pastoris* و *H. polymorpha* بر اساس روش Haaning et al. (1997) با برخی تغییرات استخراج شد (Haaning et al. 1997). سلول‌های حاصل از کشت شبانه کلنی‌های مثبت در پنج میلی‌لیتر محیط YPD (عصاره مخمر ۱٪، پپتون ۱٪ و گلوکز ۲٪) با OD_{600}=۲-٤ با استفاده از سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۵ دقیقه) از روشناور جداسازی شدند. سلول‌ها در ۷۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris-CL، ۱ mM EDTA، PH=۸) حل شدند و پس از چند ثانیه همزنی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه نگه‌داری شدند و سپس دوباره هم‌زنی شدند. این فرایند سه بار تکرار شد. نهایتاً سوسپانسیون سانتریفیوژ شد و روشناور به یک میکروتیوب تمیز انتقال داده شد. جهت حذف RNA، روشناور با آنزیم ریبونوکلئاز در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. جهت حذف آلودگی‌های پروتئینی، روشناور با محلول کلروفورم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤:۱ به مدت پنج دقیقه تیمار شد. سپس محلول سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰g، ۱۰ دقیقه) و فاز رویی محتوی DNA به میکروتیوب جدید منتقل شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده و نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲٦۰ به۲۸۰ نانومتری بالاتر از ۱/۸ داشتند جهت بررسی‌های بعدی انتخاب شدند.

به‌منظور اجتناب از اثر دز ژن بر مقایسه سطح بیان آنزیم سلولاز تحت کنترل دو راه‌انداز AOX1 و MOX، در کلنی‌های غربال شده از روش Real-Time PCR جهت تشخیص کلنی‌های حاوی یک یا بیش از یک‌کپی (چندکپی) استفاده شد (Abad et al. 2010). ابتدا بر اساس ناحیه راه‌انداز MOX، ژن *CMC3* و ژن داخلی *ARG4*[2] مخمر سه جفت آغازگر طراحی شد (جدول ۱).

[1] Pichia Adenine Dropout

[2] Arginisucccinate lyase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

طول قطعه تکثیری به‌ترتیب ۸۹، ۱۰۱و ۱۰۵ باز برای راه‌انداز MOX، *CMC3* و ژن *ARG4* به‌عنوان ژن مرجع داخلی بود. جهت فرایند Real-Time PCR از کیت FIREpol EvaGreen شرکت Solis BioDyne استفاده شد. نیمرخ حرارتی واکنش‌های PCR شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ٤۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر قطعات اسیدنوکلئیک بود. منحنی‌های استاندارد جهت تعیین کمی تعداد نسخه الحاقی ترسیم شدند. برای این منظور یک نانوگرم از DNA ژنومی استخراج شده در حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتری مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت تعداد کپی نرمال شده بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{تعداد کپی ژن هدف} = \frac{\text{تعداد کپی نرمال نشده}}{\text{تعداد کپی ژن کالیبره کننده داخلی } (ARG4)}$$

با توجه به اینکه راه‌انداز MOX قبلا در مخمر *P. pastoris* مورد استفاده قرار نگرفته بود و اطلاعاتی درباره نحوه خوراک‌دهی مناسب با متانول جهت القای این راه‌انداز وجود نداشت، ابتدا سه روش خوراک‌دهی با متانول بر اساس مقدار متانول افزوده شده به محیط (مطابق جدول ۲) طراحی شد. بدین منظور تعدادی از کلون‌های مثبت تک‌کپی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط YPD (YP+ گلوکز ۲٪) به مدت ٤۸ ساعت کشت داده شدند و پس از رسیدن به رشد مناسب (OD_{600}= ۲-٤) جمع‌آوری شده و سلول‌ها رسوب داده شدند (سانتریفیوژ ۵۰۰۰g، ۱۰ دقیقه). سلول‌ها دوباره در۱۰ میلی‌لیتر محیط BMMY (BMY+ متانول) با OD_{600}=۱ حل شدند و به مدت ۹٦ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت شیک ۲۵۰ دور بر دقیقه (۲۰۰g) گرماگذاری شدند. در پایان سلول‌ها رسوب داده شده و میزان تولید آنزیم به روش سنجش فعالیت آنزیم بررسی شد.

پس از تعیین بهترین روش خوراک‌دهی با متانول (روش الف جدول ۲)، کلنی‌های تک کپی حاوی سازه‌های pPINK-HC- MOX- *CMC3* و pPINK-HC-AOX1- *CMC3* غربال شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط YPD (YP+ گلوکز ۲٪) به مدت ٤۸ ساعت کشت داده شدند و پس از رسیدن به رشد مناسب (OD_{600}= ۲-٤) جمع‌آوری شده و سلول‌ها رسوب داده شدند (سانتریفیوژ ۵۰۰۰g، ۱۰ دقیقه). سلول‌ها دوباره در۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BMMY (BMY+ متانول ۵۰٪) با OD_{600}=۱ حل شدند و به مدت ۹٦ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت شیک ۲۵۰ دور بر دقیقه (۲۰۰g) انکوبه شدند. خوراک‌دهی روزانه با متانول یک درصد جهت حفظ رشد و همچنین القا بیان انجام پذیرفت. هر ۲٤ ساعت مقدار یک میلی‌لیتر روشناور جهت بررسی بیان آنزیم‌ها و زیست توده برداشت شد. نهایتاً پس از ۹٦ ساعت، سلول‌ها به‌وسیله سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۵ دقیقه) جمع‌آوری و روشناور جهت بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه SDS-PAGE بر اساس روش laemmli et al. (1970) و با استفاده از دستگاه ژل الکتروفوز افقی Bio-Rad انجام پذیرفت (Laemmli et al. 1970). به این منظور ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی دو بخش، تفکیک کننده ۱۲٪ و فشرده کننده ۸٪، با ضخامت ۱/۵ میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. روشناور حاصل از کشت در ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه حل شد و سپس به مدت پنج دقیقه در آب جوشانده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها، در حدود ۲۰-۱۰ میکرولیتر از هر نمونه (مساوی بین همه نمونه‌ها) به درون چاهک‌ها بارگذاری شد. ژل‌ها تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت و ٤۰۰ میلی‌آمپر به مدت یک ساعت بارگذاری شدند. پس از پایان مرحله بارگذاری، ژل‌ها با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Wray et al. 1981). آزمون زایموگرافی بر اساس روش (2014) Gastelum-Arellanez et al. انجام پذیرفت (Gastelum-Arellanez et al. 2014). به‌طور خلاصه، سوسبسترای فعالیت آنزیم CMC3 (کربوکسی‌متیل‌سلولز ۰/۱٪) به درون بافر تفکیک‌کننده اضافه شد. پس از پایان مرحله بارگذاری، ژل‌ها توسط بافر شستشو (بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار، Triton-x-100 ۰/۱٪، PH=٦/۸) به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند. پس از شستشو، ژل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در همین بافر ولی بدون حضور Triton-X-100 بدون شیک به مدت یک ساعت نگه‌داری شدند. رنگ‌آمیزی با محلول رنگی کونگو رد[1] ۰/۲٪ انجام شد و پس از ظهور نواحی روشن متناظر فعالیت سلولاز بتااندوگلوکاناز، رنگ‌زدایی توسط محلول دو مولار سدیم کلراید انجام شد.

[1] Congo red

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

فعالیت سلولازی بتااندوگلوکاناز CMC3 به روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف دی‌نیتروبنزوئیک سالیسیلیک اسید (DNS) انجام شد (Miller 1959). مخلوط واکنش شامل ۵۰-۲۵ میکرولیتر روشناور (مساوی بین همه نمونه‌ها) کشت سلولی به‌علاوه ۵۰۰ میکرولیتر بافر واکنش (شامل کربوکسی‌متیل‌سلولز ۱٪ محلول در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ٦/٥ =PH) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. جهت خاتمه واکنش ۱۰۰ میکرولیتر محلول سود شش مولار به مخلوط واکنش اضافه و ورتکس شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر محلول DNS به تیوب واکنش اضافه شد و پس از چند ثانیه ورتکس ملایم، مخلوط واکنش به مدت پنج دقیقه جوشانده شد. پس از سرد شدن به سرعت جذب واکنش در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت شد. پس از رسم منحنی استاندارد، یک واحد فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار آنزیم لازم جهت رهاسازی یک میکروگرم گلوکز احیاشده در دقیقه بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$u/ml = \frac{\text{حجم واکنش (ml)} \times \text{قند احیا شده}}{\text{میزان جذب (ml)} \times \text{حجم سوپرناتانت (ml)} \times \text{زمان (min)}}$$

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات انجام شده بیان موفق پروتئین نوترکیب در میزبان به‌طور مستقیم به خصوصیات سیستم بیانی مانند سویه و به‌خصوص راه‌انداز بستگی دارد (Redden and Alper 2015). مخمر *P. pastoris* توانایی بالایی در بیان پروتئین نوترکیب تحت راه‌انداز AOX1 دارد (Boonvitthya et al. 2013). همگام با اهمیت در فن‌آوری پروتئین نوترکیب، وجود راه‌اندازهای قوی، کوتاه و با کنترل دقیق از اجزای کلیدی توسعه زیست‌شناسی صناعی است (Redden and Alper 2015). تاکنون جستجو برای راه‌اندازهای کوتاه و قدرتمند به ندرت باعث شناسایی انواع قوی‌تری از راه‌انداز AOX1 شده‌است (Gasser et al. 2015). مخمرهای متیل‌دوست دارای شباهت‌هایی در مسیر متابولیسم متانول هستند. این شباهت به‌وسیله کاربرد هترولوگ راه‌اندازهایی مانند AOX1 در سایر مخمرهای متیل‌دوست اثبات شده‌است (Raschke et al. 1996). سلولازها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که پلیمر سلولز را به گلوکز و سایر قندهای کوچک‌تر هیدرولیز می‌کنند. در مطالعات قبلی صورت گرفته در آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی مشخص شد که مخمر *P. pastoris* توانایی مناسبی در بیان این پروتئین‌های نوترکیب تحت کنترل راه‌انداز AOX1 دارد. روش‌های مختلفی برای سنجش فعالیت سلولاز وجود دارد که اکثر آن‌ها سریع، ساده و کمی هستند (Shuangqi et al. 2011). این خصوصیات باعث شده‌است که این دسته از آنزیم‌ها برای کاربرد به‌عنوان ژن گزارشگر در مخمر *P. pastoris* *مناسب* باشند. ژن *MOX* مخمر *H. polymorpha* به شدت در سطح رونویسی القا می‌شود و راه‌اندازه این ژن از ایده‌آل‌ترین راه‌اندازها برای بیان پروتئین نوترکیب در این مخمر است (Avgerinos et al. 2001; Gellissen 2000). در این تحقیق راه‌انداز MOX با طول ۵۳۳ باز برای کاربرد هترولوگ جهت بیان سلولاز نوترکیب CMC3 در مخمر *P. pastoris* مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تایید الحاق توالی‌های MOX و *CMC3* به درون حامل‌های pPINK-HC به روش هضم دوگانه حامل (شکل ۱)، انتقال ناقل نهایی به درون لوکوس *TRP2* ژنوم مخمر *P. pastoris* به روش الکتروپوریشن انجام شد. کلنی‌های مثبت حاوی سازه pPINK-HC-MOX-*CMC3* و pPINK- HC-AOX1-*CMC3* به روش PCR و بر اساس تکثیر توالی‌های *CMC3* و MOX (شکل ۲) و همچنین رشد بر روی محیط انتخابی PAD انتخاب شدند. پس از غربالگری کلنی‌های مثبت حاوی ناقل‌ها، کلون‌های حاوی یک کپی از ناقل‌های الحاقی به روش Real-Time PCR غربالگری شدند. روش Real-Time PCR برخلاف روش‌های سنتی تشخیص تعداد نسخه ژن که هزینه و زمان زیادی را لازم دارند و از طرفی بشدت مستعد خطای کاربر هستند سریع، کارآمد و کم هزینه است (D'haene et al. 2010) از این‌رو این روش بطور گسترده برای تشخیص تعداد کپی ژن در میزبان‌هایی مانند گیاهان و انسان استفاده می‌شود (Shepherd et al. 2009). تاکنون اطلاعات زیادی در خصوص بهینه‌سازی این روش برای تشخیص تعداد کپی درج شده در ژنوم مخمرها به‌خصوص مخمر *P. pastoris* وجود نداشته است. Abad et al. (2010) نخستین بار از این روش برای تعیین تعداد نسخه درج شده در ژنوم مخمر *P. pastoris* استفاده کردند. با توجه به اینکه در هنگام ارائه آن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

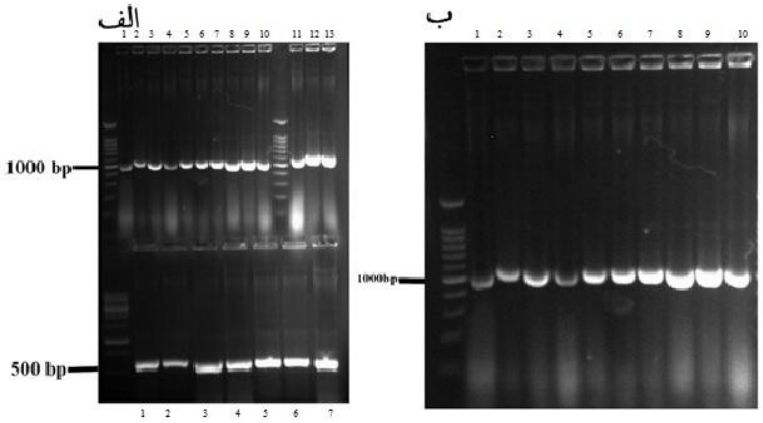
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

تحقیق هنوز ژنوم این مخمر به‌طور کامل توالی‌یابی نشده بود اطلاعات حاصل از آن مستعد خطا بود. اما با انتشار نخستین توالی‌یابی دقیق ژنوم این مخمر (Ravin et al. 2013) استفاده از این روش هرچه بیشتر مورد توجه است. در این تحقیق با بهینه‌سازی این روش از نتایج آن جهت تشخیص و تفکیک کلنی‌های حاوی یک و بیش از یک کپی از ژن درج شده *CMC3* تحت کنترل راه‌انداز MOX استفاده شد (نتایج نشان داده نشده است). به‌منظور اجتناب از اثر در ژنی بر بیان پروتئین نوترکیب CMC3، کلنی‌های حاوی یک نسخه از ژن درج شده به روش Real-Time PCR شناسایی و در ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

با توجه به اینکه نخستین بار است که از راه‌انداز MOX برای بیان پروتئین نوترکیب به‌وسیله خوراک‌دهی با متانول در مخمر *P. pastoris* استفاده می‌شود و به همین دلیل اطلاعات کافی در خصوص نحوه فعالیت راه‌انداز MOX تحت این خوراک در این مخمر وجود ندارد، اثر سه روش مختلف متانول‌دهی بر اساس مقادیر افزوده شده به محیط بر حسب حجمی- حجمی بر بیان کلنی‌های تک‌کپی مثبت حاوی ناقل‌های pPINK-HC-MOX-*CMC3* در محیط BMMY بررسی شد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه روش‌های مختلف خوراک دهی با متانول بر بیان سلولاز CMC3 تحت کنترل راه‌انداز MOX.

میانگین بیان CMC3 تحت راه‌انداز MOX	روش خوراک‌دهی	خوراک‌دهی با متانول
۵۷۶	افزایش نیم درصد حجمی/ حجمی متانول در روز اول کشت و سپس افزایش یک درصد حجمی/ حجمی به صورت روزانه به مدت سه روز	الف
٤٨٧	افزایش نیم درصد حجمی/ حجمی متانول در روز اول کشت و سپس افزایش هشت دهم حجمی/ حجمی به صورت روزانه به مدت سه روز	ب
۵۲۳	افزایش یک درصد حجمی/ حجمی متانول حجمی/ حجمی به مدت چهار روز	پ



شکل ۲- غربالگری کلنی‌های ترنسفرم مخمر پیکیا پاستوریس بر اساس الکتروفورز محصولات PCR ژن CMC3 و راه‌انداز MOX. در تمامی تصاویر چاهک اول از چپ نشانگر DNA است.

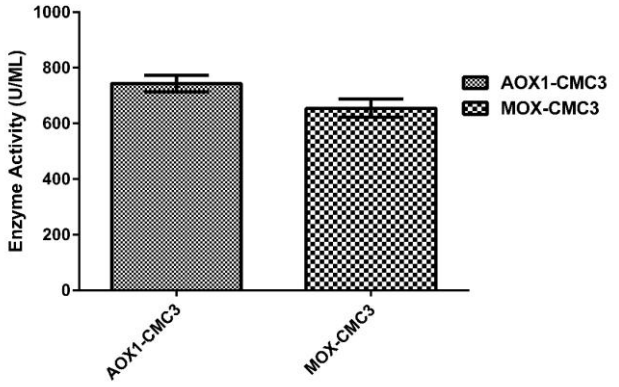
الف- غربالگری کلنی‌های حاوی سازه pPINK-HC-MOX-CMC3 بر اساس تکثیر توالی‌های MOX (چاهک‌های پایین شکل- شماره ۱ تا ۷) و CMC3 (چاهک‌های بالای شکل- شماره ۱ تا ۱۳).

ب- غربالگری کلنی‌های حاوی سازه pPINK-HC-AOX1-CMC3 بر اساس تکثیر توالی CMC3 (چاهک‌های ۱ تا ۱۰).

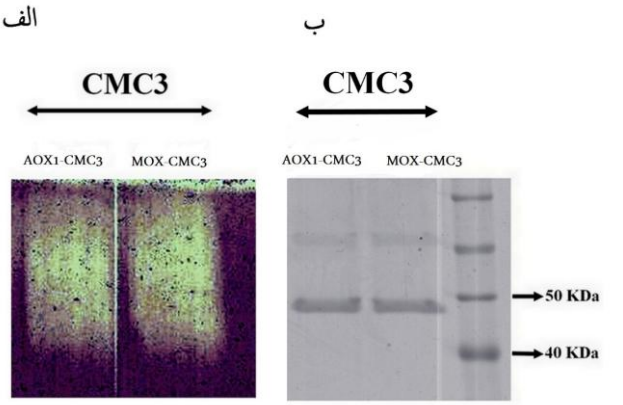
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

نتایج اولیه نشان داد که هر سه روش خوراک‌دهی موجب بیان مناسب پروتئین CMC3 در میزبان می‌شوند (جدول ۲). مقایسه روش‌های مختلف خوراک‌دهی نشان داد که بین روش‌های مختلف خوراک‌دهی روش الف (افزودن مقادیر ۰۵، ۱، ۱ و ۱ درصد حجمی/ حجمی متانول در طی روزهای القا بیان آنزیم) با تولید ۵۷٦ واحد آنزیم نسبت به روش ب با ٤۸۷ و روش پ با ۵۲۳ واحد آنزیم با اختلاف دارای بیشترین بیان آنزیم سلولاز بود (جدول ۲) و در ادامه این روش خوراک‌دهی برای راه‌انداز MOX مورد استفاده قرار گرفت. مطابق نتایج به‌دست آمده در مطالعات قبلی در این آزمایشگاه (آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی) بهترین روش خوراک‌دهی برای راه‌انداز AOX1 به صورت افزایش روزانه ۰۵، ۱، ۱ و ۱ درصد حجمی/ حجمی است که در این تحقیق نیز همین روش استفاده شد. بیان اولیه به‌دست آمده نشان داد که علی‌رغم تفاوت گسترده توالی بین راه‌انداز سنتی AOX1 با طول ۹۳۹ باز و راه‌انداز MOX با طول ۵۳۳ باز، ماشین رونویسی این مخمر با موفقیت توانست نقطه صحیح شروع رونویسی را تشخیص و پروتئینی با فعالیت صحیح متابولیکی تولید کند. استفاده از راه‌اندازهای مخمرهای متیل‌دوست به‌صورت هترولوگ گزارش شده‌است. بیشتر از راه‌انداز AOX1 مخمر *P. pastoris* برای بیان پروتئین در مخمر *H. polymorpha* استفاده شده‌است (Raschke et al. 1996). استفاده از راه‌انداز مخمر *H. polymorpha* به‌صورت هترولوگ در *P. pastoris* گزارش نشده‌است و این نخستین گزارش در مورد استفاده از یک راه‌انداز هترولوگ قدرتمند برای بیان پروتئین نوترکیب در مخمر *P. pastoris* است. گزارشات مختلفی در خصوص شباهت ژنتیکی مسیر متابولیسم متانول در مخمرهای متیل‌دوست وجود دارد (Egli et al. 1980; Tschopp et al. 1987) نتایج مطابق با گزارشات پیشین شباهت تنظیم مسیر متابولیسم متانول را نشان می‌دهد چرا که تنظیم موفق راه‌انداز هترولوگ MOX در میزبانی غیر از میزبان طبیعی آن نشان می‌دهد سیستم تنظیمی ژن‌های مسیر متابولیسم متانول، بالاخص ژن الکل‌اکسیداز، در میان مخمرهای متیل‌دوست شباهت بالایی دارد. پس از ٤۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول نتایج تولید قدرتمند آنزیم CMC3 تحت کنترل راه اندازهای AOX1 و MOX را نشان داد (شکل ۳).

تجزیه زایموگرافی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده نشان دهنده هاله‌ای شفاف و روشن بر روی ژل بود که نشان‌دهنده فعالیت کربوکسی‌متیل‌سلولازی بالای آنزیم‌های تولید شده بود (شکل ٤ الف).



شکل ۳- بیان سلولاز CMC3 تحت کنترل دو راه‌انداز MOX و AOX1 پس ٤۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول



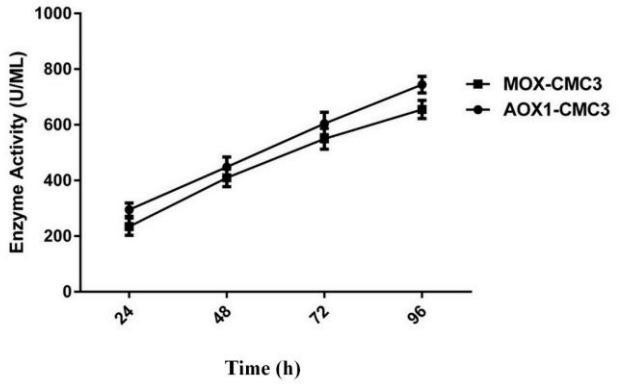
شکل٤- تجزیه زایموگرافی (الف) و SDS-PAGE (ب) پروتئین نوترکیب CMC3 تولید شده تحت کنترل راه‌اندازهای MOX و AOX1 پس از ٤۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول.

فعالیت کربوکسی‌متیل‌سلولازی بالا و همچنین بیان بالای سلولاز CMC3 تحت دو راه‌انداز مختلف در مخمر *P. pastoris* نشان دهنده توانایی مناسب این مخمر در بیان آنزیم‌های سلولازی است. پروتئین‌های نوترکیب تولید شده دارای وزن مولکولی نزدیک به ۵۰ کیلودالتون بودند که نشان‌دهنده افزایش وزن مولکولی پروتئین نوترکیب بیان شده تحت کنترل هر دو راه‌انداز نسبت به وزن مولکولی طبیعی سلولاز CMC3 با ٤۲ کیلودالتون

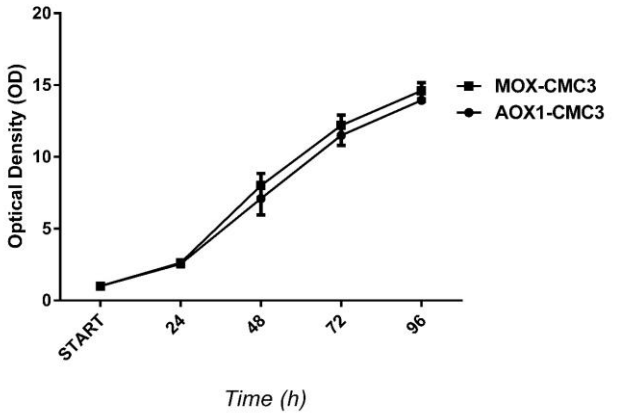
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

بود (شکل٤ ب). افزایش وزن مولکولی پروتئین نوترکیب در مخمر *P. pastoris* به‌دلیل گلیکوزیلاسیون بالا در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده‌است (Boer et al. 2000). آنزیم CMC3 دارای دو جایگاه اِن- گلیکوزیلاسیون و چندین جایگاه بالقوه اُ- گلیکوزیلاسیون است که بیش- گلیکوزیلاسیون می‌تواند عامل این اختلاف وزن مولکولی بین پروتئین نوترکیب و غیرنوترکیب باشد. بیان پروتئین نوترکیب CMC3 و نحوه رشد مخمر *P. pastoris* تحت دو راه‌انداز مختلف طی یک دوره ۹٦ ساعته خوراک‌دهی با متانول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج افزایش معنادار و پیوسته بیان آنزیم سلولاز CMC3 تحت کنترل دو راه‌انداز MOX و AOX1 با افزایش زمان خوراک‌دهی با متانول را تا ۹٦ ساعت نشان دادند (شکل ٥). این نتایج بیان بالاتر آنزیم CMC3 تحت کنترل راه‌انداز AOX1 در مقایسه با راه‌انداز MOX را نشان دادند. پس از ۹٦ ساعت به‌صورت میانگین بیش از ۷۲۷ و ٦۳۰ واحد آنزیم CMC3 به‌ترتیب تحت کنترل راه‌انداز AOX1 و MOX تولید شد که نشان دهنده تقریباً ۱۳ درصد بیان بیشتر تحت راه‌انداز AOX1 بود. راه‌انداز AOX1 بیش از دو دهه است که مورد دست‌ورزی‌های مختلف قرار گرفته است که این موضوع بر قدرت این راه‌انداز به‌شدت افزوده است (Portela et al. 2017). با توجه به محدود بودن تعداد راه‌اندازهای قدرتمند در مخمر *P. pastoris*، مهندسی راه‌انداز به‌شدت مورد توجه بوده است و به‌عنوان یکی از راهکارهای مؤثر برای بهبود تولید پروتئین نوترکیب در این مخمر مورد بحث قرار گرفته است (Weinhandl et al. 2014). از روش‌های گوناگونی مانند Ep- PCR[1] و یا جهش‌زایی هدفمند برای مهندسی راه‌انداز استفاده می‌شود که با توجه به‌عدم شناخت کافی از نحوه تنظیم دقیق راه‌اندازهای مخمری به‌شدت به‌طول راه‌انداز وابسته است و از این روی کاربرد راه‌انداز کوتاه بسیار مورد توجه است (Redden and Alper 2015).

طول کوتاه‌تر راه‌انداز MOX امکان مهندسی آن را نسبت به راه‌انداز AOX1 آسان‌تر می‌کند که می‌تواند برای محققین این حوزه بسیار جذاب باشد. وضعیت رشد مخمرهای حامل ناقل‌های بیانی طی ۹٦ ساعت خوراک‌دهی با متانول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار در میزان رشد بین مخمرها بود (شکل ٦). با توجه به الگوی خوراک‌دهی یکسان و عدم وجود اختلاف معنادار در الگوی رشدی کلون‌های حاوی سازه‌های MOX- *CMC3* و AOX1- *CMC3* می‌توان این‌چنین استدلال کرد که بر اثر القا شدید راه‌انداز MOX تحت خوراک‌دهی با متانول (همچون راه‌انداز قدرتمند AOX1) نخستین گام در حفظ ایمنی سلول در مقابله با اثرات سمی متانول یعنی تغییر شکل آن به مولکولی با سمیت کمتر به‌خوبی انجام گرفته است که اثر مثبت خود را بر حفظ رشد مناسب همچون کلون دارای راه‌انداز AOX1 نشان داده است.



شکل ٥- بررسی بیان پروتئین‌های نوترکیب CMC3 تحت کنترل راه‌انداز MOX و AOX1 پس از ۹٦ ساعت رشد و خوراک‌دهی با متانول.



شکل ٦- بررسی رشد مخمرهای بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب CMC3 تحت کنترل راه‌اندازهای MOX و AOX1 پس از ۹٦ ساعت رشد و خوراک‌دهی با متانول.

[1] Error pron- PCR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

در این تحقیق از توالی راهنمای طبیعی آنزیم سلولاز CMC3 به طول ۱۶ اسید آمینه با توالی MKHSVLAGLFATG جهت ترشح پروتئین نوترکیب به محیط کشت استفاده شد که بر اساس نتایج توانسته است پروتئین تولیدی را با موفقیت به محیط کشت ترشح کند و می‌تواند به‌عنوان توالی ترشحی جدیدی جهت ترشح پروتئین نوترکیب به محیط بیرون سلول مخمر *P. pastoris* مورد بررسی‌های بیشتری قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه راه‌انداز کوتاه MOX از مخمر *Hansenula polymorpha* برای کاربرد هترولوگ در بیان پروتئین نوترکیب تحت خوراک‌دهی با متانول در مخمر *Pichia pastoris* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بیان موفق و قابل مقایسه آنزیم CMC3 تحت کنترل این راه‌انداز با راه‌انداز متداول AOX1 را نشان دادند. این مطالعه گزارشی در خصوص کاربرد موفق یک راه‌انداز از سایر مخمرها به‌صورت هترولوگوگ جهت تولید پروتئین نوترکیب در مخمر *P. pastoris* است.

منابع

Abad S, Kerstin K, Astrid H, Ulrike S, Franz SH, Anton G (2010) Real-Time PCR-Based Determination of Gene Copy Numbers in *Pichia Pastoris*. Biotechnology Journal 5:413-20.

Avgerinos GC, Turner BG, Gorelick KJ, Papendieck A, Weydemann U, Gellissen G (2001) Production and Clinical Development of a Hansenula Polymorpha-Derived PEGylated Hirudin. In: Thrombosis and Hemostasis Congress 27:357-71.

Boonvitthya N, Sophie B, Vorakan B, Michael JO, Warawut C (2013) Comparison of the Heterologous Expression of *Trichoderma Reesei* Endoglucanase II and Cellobiohydrolase II in the Yeasts *Pichia Pastoris* and *Yarrowia Lipolytica*. Molecular Biotechnology 54:158–69.

Chen P, Fu TB, Ye XY (2011) Expression of a Secretory Beta-Glucosidase from *Trichoderma Reesei* in *Pichia Pastoris* and Its Characterization. Biotechnoly Letters 33:2475-79.

Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989) Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia Pastoris*. Molecular and Cellular Biology 9:1316-23.

D'haene B, Vandesompele JO, Hellemans J (2010) Accurate and Objective Copy Number Profiling Using Real-Time Quantitative PCR. Methods 50: 262-270.

Egli Th, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A (1980) Methanol Metabolism in Yeasts: Regulation of the Synthesis of Catabolic Enzymes. Archives of Microbiology 124:115-21.

Egli Th, Käppeli O, Fiechter A (1982) Regulatory Flexibility of Methylotrophic Yeasts in Chemostat Cultures: Simultaneous Assimilation of Glucose and Methanol at a Fixed Dilution Rate. Archives of Microbiology 131:1-7.

Gasser B, Matthias GS, Diethard M (2015) Methanol Regulated Yeast Promoters: Production Vehicles and Toolbox for Synthetic Biology. Microbial Cell Factories 14.196-219.

Gastelum-Arellanez A, Paredes-López O, Olalde-Portugal V (2014) Extracellular Endoglucanase Activity from Paenibacillus Polymyxa BEb-40: Production, Optimization and Enzymatic Characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30:53-65.

Gellissen G (2000) Heterologous Protein Production in Methylotrophic Yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology 54:41-50.

Gödecke S, Eckart M, Zbigniew AJ, Hollenberg CP (1994) Identification of Sequences Responsible for Transcriptional Regulation of the Strongly Expressed Methanoi Oxidase-Encoding Gene in *Hansenula Polymorpha*. Gene 139:35-42.

Haaning J, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L (1997) Simple and Reliable Procedure for PCR Amplification of Genomic DNA from Yeast Cells Using Short Sequencing Primers. Biochemistry and Molecular Biology International 42:169-72.

Hasslacher M, Schall M, Marianne H, Rudolfo B, Karl R, Johannes L, Herfried G, Sepp DK, Schwab H (1997) High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree Hevea Brasiliensis in Microbial Hosts. Protein Expression and Purification 11:61-71.

Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Olof enfors S (2006) Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia Pastoris*. Biotechnology Progress 22:1465-73.

Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227:680-85.

Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D (2012) Recombinant Protein Production in Yeasts. Methods in Molecular Biology 824:329-58.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]

Mellitzer A, Weis R, Glieder A, Flicker K (2012) Expression of Lignocellulolytic Enzymes in *Pichia Pastoris*. Microbial Cell Factories 11: 61-79.

Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry 31:426-28.

Portela RMC, Vogl T, Ebner K, Oliveira R, Glieder A (2018) *Pichia Pastoris* Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Core Promoter Engineering by High Resolution Systematic Mutagenesis. Biotechnology Journal 13: 17-31.

Raschke WC, Neiditch BR, Hendricks M, Cregg JM-- (1996) Inducible Expression of a Heterologous Protein in Hansenula Polymorpha Using the Alcohol Oxidase 1 Promoter of *Pichia Pastoris*. Gene 177:163-67.

Ravin, NV, Michael A, Vitaly EVK, Alexey VB, Schneider J, Eugenia S, Mardanova M, Zvereva M, Dontsova OA, Mardanov AV, Konstantin GS (2013) Genome Sequence and Analysis of Methylotrophic Yeast *Hansenula Polymorpha* DL1. BMC Genomics 14: 814-837.

Redden H, Alper HS (2015) The Development and Characterization of Synthetic Minimal Yeast Promoters. Nature Communications 6. DOI: 10.1038/ncomms8810.

Shepherd CT, Adrienne NML, Paul S (2009) Determination of Transgene Copy Number by Real-Time Quantitative PCR. Methods in Molecular Biology 526: 129-134.

Shuangqi T, Wang Z, Fan Z, Zuo L, Wang J (2011) Determination Methods of Cellulase Activity. African Journal of Biotechnology 10: 7122-7125.

Sukumaran RK, Reeta RS, Ashok P (2005) Microbial Cellulases - Production, Applications and Challenges. Journal of Scientific and Industrial Research 64: 832-44.

Tschopp JF, Paul FB, James MC, Cathy AS, Thomas RG (1987) Expression of the lacZ Gene from Two Methanol-Regulated Promoters in *Pichia Pastoris*. Nucleic Acids Research 15:3859-76.

Vogl T, Glieder A (2013) Regulation of *Pichia Pastoris* Promoters and Its Consequences for Protein Production. New Biotechnology 30:385-404.

Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A (2014) Carbon Source Dependent Promoters in Yeasts. Microbial Cell Factories 13.5. doi: 10.1186/1475-2859-13-5.

Werten MWT, Van Den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, De Wolf F (1999) High-Yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia Pastoris*. Yeast 15:1087-96.

Wongwisansri S, Peerada P, Panida M, Roongsawang N, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2013) High-Level Production of Thermotolerant β-Xylosidase of Aspergillus Sp. BCC125 in *Pichia Pastoris*: Characterization and Its Application in Ethanol Production. Bioresource Technology 132:410-13.

Wray W, Boulikas T, Virginia W, Hancock R (1981) Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 118:197-203.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.2.6]