Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 3 (10-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media for Recombinant ONTAK Immunotoxin Production

Mohammad Heydari, Syed Morteza Robatjazi, Mehadi Zeinoddini, Ehsan darabi

Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/04/10
Accepted:2014/06/25
Available online:2014/07/20

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 1393; 8(3): P 51-57

Corresponding author at:

Dr. Syed Morteza Robatjazi

Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

Email:
s_m_robatjazi@mut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Immunotoxin is a cytotoxic protein and have been proposed as a novel compound for cancer therapy. ONTAK is a recombinant immunotoxin composed diphtheria toxin fused to interleukin 2(IL2). In this study, optimization of defined culture medium for the expression of recombinant ONTAK immunotoxin has been investigated.

Materials and Methods: In this study, the bacterial strain BL21 (DE3) was transformed with the recombinant plasmid PET-IDZ was used to express ONTAK. The medium composition such as carbon source (glucose, sucrose and glycerol), nitrogen source (ammonium chloride, urea and ammonium sulfate) and concentration of the inductor IPTG (0.1, 0.5, 1mM), induction time and concentration of various additives (different amino acids) were optimized based on Taguchi method for increasing expression on the shake flask cultivation. The cell concentration was measured by optical density at 600 nm and protein expression levels were analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE gel.

Results: Modified defined culture medium containing (g/l): glucose,8.0; K_2HPO_4,15.0; KH_2PO_4,7.5; Citric acid,2; NH_4Cl,3; $MgSO_4.7H_2O$,1; were determined as optimal culture medium. OD_{600nM}=2.0 was determined as the best time for induction by IPTG at a concentration of 0.1mM. ONTAK expression was increased by adding Valine, 0.0502; Phenylalanine, 0.0132; Lysine, 0.0184; Aspartic acid, 0.0160 and Serine, 0.0251(g/l) amino acids to the medium.

Conclusions: In present study, the Taguchi method analysis revealed that, nitrogen source type (NH_4CL 3 g/l) significantly affects in the cell growth. The biomass production was on the optimized medium about over 3 times higher than that at M9 medium.

Key Words: Recombinant Immunotoxin, ONTAK, Optimization

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Heydari M, Robatjazi S, Zeinoddini M, Darabi E. Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media for Recombinant Immunotoxin (ONTAK) Production Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media for Recombinant ONTAK Immunotoxin Production. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) :51-57

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بهینه سازی ترکیب شیمیایی محیط کشت سلولی معین برای تولید ایمونوتوکسین نوترکیب اونتاک

محمد حیدری، سید مرتضی رباط جزی، مهدی زین الدینی، احسان دارابی

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۳/۱۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۲۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۷/۰۵

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1392; 8(3): P 51-57

نویسنده مسئول:

دکتر سید مرتضی رباط جزی

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۲۹۷۴۶۰۶

پست الکترونیک:

s_m_robatjazi@mut.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: ایمونوتوکسین یک پروتئین سمی است که به عنوان یک ترکیب نوین برای درمان سرطان پیشنهاد شده است. اونتاک یک ایمونوتوکسین نوترکیب می باشد که از توکسین دیفتری هیبرید شده با اینترلوکین۲ تشکیل شده است. در این مطالعه بهینه سازی ترکیب محیط کشت معین بمنظور بیان اونتاک بررسی شده است.

مواد و روش کار: در این تحقیق از باکتری سویه BL21(DE3) ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب PET-IDZ جهت بیان اونتاک استفاده گردید. ترکیب محیط کشت همچون منبع کربن(گلوکز، ساکارز و گلیسرول)، منبع نیتروژن (کلرید آمونیوم، اوره و سولفات آمونیوم)، غلظت های مختلف IPTG به عنوان القاگر (۱/۰ , ۰/۵ , ۱ mM)، زمان القاء و غلظت های مختلف اسید آمینه برای افزایش بیان در کشت فلاسک لرزان بر اساس روش تاگوچی بهینه سازی شده است. غلظت سلول بر اساس روش کدورت سنجی اندازه گیری شده و میزان بیان پروتئین توسط الکتروفورز روی ژل SDS-PAG مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: محیط کشت معین اصلاح شده حاوی (*g/l*): *glucose:8*، K_2HPO_4*:15*، KH_2PO_4*: 7.5*، *Citric acid:2*، NH_4CL*:3*، $MgSO_4.7H_2O$*:1gl* به عنوان محیط کشت بهینه تعیین گردید. بهترین زمان القاء توسط *IPTG* با غلظت *0.1mM*، در کدورت نوری OD_{600nM}*=2* تعیین شد. با اضافه کردن اسیدهای آمینه (*g/l*): *Valine,0.0502; Pheyalanine,0.0132; Lysine,0.0184; Aspartic acid,0.0160; Serine,0.0251*، به محیط کشت، بیان پروتئین اونتاک افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، آنالیز نتایج به روش تاگوچی مشخص کرد که نوع منبع نیتروژن (کلریدآمونیوم *3 g/l*) تاثیر قابل توجهی در رشد سلول داشته است. تولید توده زیستی در محیط کشت بهینه سازی شده نسبت به محیط کشت *M9*، تقریبا *3* برابر بوده است.

کلمات کلیدی : ایمونوتوکسین نوترکیب، اونتاک، بهینه سازی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

امروزه اکثر پروتئین‌های درمانی محصولات نوترکیب هستند که در مطالعات بالینی برای درمان انواع سرطان‌ها، اختلالات سیستم ایمنی، عفونت و بیماری‌های دیگر بکار می روند (۱). Paul Ehrlich که برای اولین بار رنگ آمیزی افتراقی از بافت‌های مختلف را در سال ۱۸۷۷ گزارش داد استدلال کرد که می‌توان عواملی را به طور ویژه و اختصاصی برای کشتن سلول‌های سرطانی توسعه داد. آنتی بادی های منوکلونال علاوه بر اینکه خود قابلیت استفاده به عنوان داروی ضد سرطان را دارند، می-توانند به عنوان حاملین هدفمند جهت هدایت پروتئین های سمی به سلولهای سرطانی نیز در نظر گرفته شوند. توکسین‌های پروتئینی گیاهی و باکتریایی عوامل سمی بالقوه‌ایی در طبیعت هستند که با اتصال این توکسین‌ها به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ساختارهای جدیدی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی طراحی می شوند. این پروتئین های هیبریدی ایمونوتوکسین نام گرفتند

(۳،۲). در حال حاضر ایمونوتوکسین‌ها به شکلی طراحی می‌شوند که تنها شامل عوامل مورد نیاز برای شناسایی و کشتن سلول های توموری باشند که با جابجایی دمین اتصال به سلول توکسین با بخشFV از یک آنتی‌بادی و باقی ماندن دمین‌های جای‌گیری و سلول کش اتفاق می‌افتد. این پروتئین‌های کایمریک نو ترکیب می‌توانند به شکل اقتصادی در مقیاس وسیع در اشریشیا کلی تولید گردند (۱۹).

ایمونوتوکسین یک ماده بیولوژیک و دارای دو بخش کاملاً مجزا است که توسط رابط های مشخص و بصورت کووالان به یکدیگر متصل هستند: یک بخش ایمنی که نقش تشخیصی و اتصال ایمونوتوکسین به گیرنده های خاص را برعهده دارد و یک بخش توکسینی یا سمی که نقش سیتوتوکسیک و مرگ سلولی را ایفا می کند (۴). ایمونوتوکسین ها امروزه به عنوان استراتژی نوین درمان سرطان به حساب می آیند. بر این اساس ایمونوتوکسین برپایه آنتی ژن‌های سطحی اختصاصی سلول‌های سرطانی طراحی می شود. چون پروتئین ایمونوتوکسین بر روی سلول‌های نرمال بی تاثیر می باشد باید آنتی ژن‌های سطحی مورد نظر کاملا اختصاصی سلول‌های سرطانی باشد و یا در سطح بسیار پایین در مقایسه با سلولهای سرطانی وجود داشته باشد. در حال حاضر بسیاری از ایمنو توکسین‌های نوترکیب مورد آزمایش‌های بالینی قرار گرفته اند. تعدادی از ایمنوتوکسین‌ها که به اندازه کافی پایدار هستند که برای استفاده پزشکی به کار می‌روند (۵،۴).

ایمونوتوکسین اونتاک شامل توالی اسید آمینه ی قطعه A,B (Met1-Thr387)-His از توکسین دیفتری که با توالی اینترلوکین ۲ انسانی (Ala1-Thr133) همراه شده که دارای ۵۲۱ اسید آمینه، و وزن مولکولی ۵۸ کیلودالتون می‌باشد (۱۹). این ایمونوتوکسین که برای رسپتور سطحی IL2 هدف گذاری شده است از ترکیب دمین‌های بخشهای انتقالی و فعال آنزیمی توکسین دیفتری (DT) با IL2 انسانی تشکیل شده است (۴). به عبارت دیگر در ساخت این ایمونوتوکسین دمین اتصالی DT حذف شده و به جای آن IL2 قرار می گیرد (۶). با توجه به کارایی و ویژگی های منحصر به فرد ایمونوتوکسین ها، امروزه از این پروتئین های هیبریدی به عنوان دارو استفاده می شود. ایمونوتوکسین اونتاک یک داروی ویژه برای درمان سرطان جهت درمان بیماران مبتلا به لوکمیا، لمفومای و ملانوما می باشد (۹-۷). در ۵ فوریه سال ۱۹۹۹به عنوان اولین ایمونوتوکسین از نسل سوم موفق به دریافت مجوز لازم از سازمان غذا و دارو ایالات متحده امریکا (FDA) شد. با توجه به رشد چشمگیر سرطان در جامعه ی امروزی و تحریم داروهای آن، بومی سازی ساخت داروهای نوترکیب سرطانی امری ضروری به نظر می رسد (۱۰،۴).

قابلیت تولید حجمی پروتئین نوترکیب به دو عامل غلظت توده ی زیستی و بازدهی تولید محصول بستگی دارد. بهینه سازی ترکیب و غلظت محیط کشت و شرایط محیطی در مرحله تولید از جمله راهکارهایی است که برای افزایش راندمان تولید استفاده می شود. بهینه سازی شرایط القاء به دلیل تاثیر گذاری قابل توجه روی تراکم سلولی بعد از القاء و بازدهی تولید پروتئین نوترکیب بعنوان یک رویکرد اساسی در افزایش تولید پروتئین های نوترکیب همواره مورد توجه بوده است. در این پژوهش نیز ترکیب و غلظت محیط کشت، مقدار غلظت القاگر، زمان القاء برای افزایش بازدهی تولید و بیان پروتئین اونتاک در سویه نوترکیب اشریشیاکلی که در مطالعات قبلی طراحی شده بود (۱۹)، بهینه سازی شده است.

مواد و روش‌ها

۱) سویه و شرایط محیط کشت

سویه

در این تحقیق از سویه نوترکیب *BL21(DE3)* حاوی پلاسمید pET-IDZ (طراحی و تهیه شده در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر)استفاده گردید (۱۹). برای نگهداری طولانی مدت و تهیه بانک سلولی از محیط LB (حاوی پپتون ۱۰ g/l، عصاره مخمر ۵ g/l و کلرید سدیم ۵ g/l مایع حاوی ۲۰ درصد وزنی گلیسرول و دمای ۷۰°C- استفاده شد.

مواد مصرفی

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل پودر آماده محیط کشت LB از شرکت Applichem®، بیس اکریل آمید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲-مرکاپتواتانول، بروموفنل بلو، کوماسی بلو R250، اسید استیک گلاسیال و متانول از شرکت MERCK تهیه گردید. تریس باز، IPTG، آمونیوم پرسولفات (APS) و پلی اکریل آمید از شرکت

سینا ژن تهیه شد. گلیسرول، اوره، آمونیوم کلرید، آمونیوم سولفات، سیتریک اسید، منیزیم سولفات ۷ آبه، SDS، از شرکت Sigma-Aldrich تهیه گردید. آنتی بیوتیک آمپی سیلین قابل تزریق (استریل) (Ampivil®) از داروخانه خریداری شد.

محیط کشت

محیط کشت معین M9 محیطی است که در زمینه تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار می گیرد. اجزای تشکیل دهنده آن (g/l): glucose,10.0; K_2HPO_4,15.0; KH_2PO_4,7.5; Citric acid,2; NH_4Cl,1.0; $MgSO_4.7H_2O$,1.0 می باشد (۱۱). چون ترکیب محیط کشت گفته شده به تنهایی نمی تواند مواد مغذی کافی در اختیار سلول قرار دهد غلظت سلولی پائینی نزدیک به جذب نوری ۰/۸ داشت برای اینکه غلظت سلول افزایش یابد و به تبع از آن پروتئین بیشتری تولید گردد محلولی از عناصر کمیاب (افزودنی ها) ساخته شد و به محیط کشت مورد نظر مقدار 1 ml/l از این محلول که اجزای تشکیل دهنده آن عبارتند از (g/l): $FeSO_4.7H_2O$,2.8; $MnCl_2.1H_2O$,0.91; $CoCl_2.6H_2O$,1.683; $CaCl_2.2H_20$,1.5; $CuSO_4.5H_2O$,0.2; $ZnSO_4.7H_2O$,0.3، اضافه گردید. از این محیط کشت برای تهیه مایه تلقیح استفاده شد. میزان ۱۰ ٪ مایه تلقیح ساخته شده به محیط کشت سترون شده زیر هود میکروبی و با حفظ شرایط سترون تلقیح شد. اگرچه تاکنون هیچ گزارشی در مورد بیان پروتیئن ایمونوتوکسین اونتاک در محیط کشت معین ارائه نشده است، با این وجود مطالعات قبلی نشان می دهد که نوع منبع کربن(گلوکز، گلیسرول و ساکارز)، منبع نیتروژن(کلرید آمونیوم، اوره و سولفات آمونیوم)، افزودنی های مغذی، زمان و غلظت القاء کننده، تاثیر گذار در تولید پروتئین های نوترکیب می باشند. غلظت هایی که برای منبع کربن و منبع نیتروژن انتخاب شد به ترتیب عبارتند از:g/l(8،9،10) و g/l(1,2,3). همچنین غلظت ترکیبات دیگر محیط کشت که عبارتند از: (g/l): K_2HPO_4,15.0; KH_2PO_4,7.5; Citric acid,2; $MgSO_4.7H_2O$,1.0 طبق گزارشات قبلی ثابت در نظر گرفته شد (۱۱). غلظت های متفاوت (0.1, 0.5, 1mM) از IPTG مورد بررسی قرار گرفت در این تحقیق با هدف افزایش میزان تولید ایمونوتوکسین اونتاک در محیط کشت معین، تاثیر اضافه کردن اسیدهای آمینه به ترکیب محیط کشت بررسی گردید. با توجه به توالی اسید آمینه پروتئین اونتاک مقدار و نوع اسید آمینه به کار رفته در محیط کشت عبارتند از (g/l): Valine,0.0502; Pheyalanine,0.0132; Lysine,0.0184; Aspartic acid,0.0160; Serine,0.0251. محلول اسید آمینه ساخته شده با غلظت مورد نظر یک ساعت قبل از القاء به محیط کشت اضافه شد. تاثیر اضافه کردن غلظت های (1,3,5)mM از اسیدهای آمینه در بیان پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). محلولی از اسیدهای آمینه و عناصر کمیاب به صورت غلیظ و جداگانه ساخته شد، با استفاده از رابطه $N_1V_1=N_2V_2$ آن حجم از محلول غلیظ را که باید برداشته شود به صورت میلی مولار به محیط کشت اضافه شد.

شرایط کشت

با توجه به تحقیقات قبلی، باکتری در شرایط دما: ۳۷ °C ، pH: ۷/۰، دور همزن ۲۵۰ rpm تکثیر گردید (۱۲،۱۱). اجزای محیط کشت استریل گردید و به محیط کشت استریل از آمپی سیلین به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد (۱۳). میزان رشد سلول ها از طریق جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. به منظور جداسازی سلول ها، میکروتیوپ های پرشده (1ml) حاوی سلول اشریشیاکلی با دور همزن: ۱۲۰۰۰ rpm، زمان: ۵ min و دما: ۴ °C سانتریفیوژ شد. همه ی آزمایشات انجام شده در ارلن 250 ml، با نسبت۱:۵:۲ (۱۰۰ ml محیط کشت) انجام گردید.

۲) ارزیابی میزان بیان به وسیله SDS-PAGE

بعد از اتمام زمان القاء و جمع آوری سلول‌ها، به هرکدام از میکروتیوپ ها ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد (برای شرایط یکسان سازی در آزمایشات مقدار بافر نمونه تغییر می کند) و به کمک ورتکس به خوبی، هم زده شد و به مدت 15min در آب جوش (دمای 100°C) حرارت داده شد تا سلول‌ها لیز شوند و پروتئین‌های آزاد شده دناتوره شوند. جهت انجام الکتروفورز، از سیستم الکتروفورز شرکت BIORAD استفاده شد. سپس نمونه ها در چاهک های ژل اکریل آمید - بیس اکریل آمید 12.5٪ ریخته شدند. ولتاژ 110 در دستگاه الکتروفورز انتخاب گردید. سپس ژ لها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و باندهای پروتئینی مشاهده و بررسی شدند (۱۴). نتایج نهایی برای انتخاب بهترین ترکیب محیط کشت بر اساس جذب نوری بدست آمده و همچنین میزان بیان پروتئین توسط الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

۳) بهینه سازی ترکیب محیط کشت با روش تاگوچی

یکی از ساده ترین، سریع ترین و در عین حال امکان پذیرترین روشهایی که امروزه در صنایع بسیار متفاوتی مورد استفاده قرار می گیرد روش تاگوچی است (۲۰). جهت طراحی محیط کشت بهینه در این پژوهش از نرم افزار Design-Expert 7.1.3 Trial استفاده شد. عوامل بکار رفته در این محیط کشت شامل دو پارامتر (منابع کربن و نیتروژن متفاوت) در سه سطح می باشد. هنگام استفاده از روش تاگوچی جهت طراحی آزمایش های فوق، در قالب آرایه متعامد L-9 صورت پذیرفت که ۹ آزمایش (جدول ۱) در نظر گرفته شد. همانطور که در قسمت محیط کشت آورده شده است از سه منبع کربن (گلوکز، ساکارز و گلیسرول) با غلظتهای (8,9,10)g/l و سه منبع نیتروژن (اوره، کلرید آمونیوم و سولفات آمونیوم) با غلظتهای (1,2,3)g/l مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این کار برهمکنش ترکیب واجزای محیط کشت (غربالگری محیط کشت) بود که در نتیجه ی آن بهترین محیط کشت از لحاظ اجزاء و غلظت به دست آید که در ادامه یافته ها به آن پرداخته شده است. برای مقایسه ی نتایج از محیط کشت M9 به عنوان شاهد که ترکیب اجزای محیط کشت آن در قسمت ۱ (محیط کشت) آورده شده است، استفاده گردید.

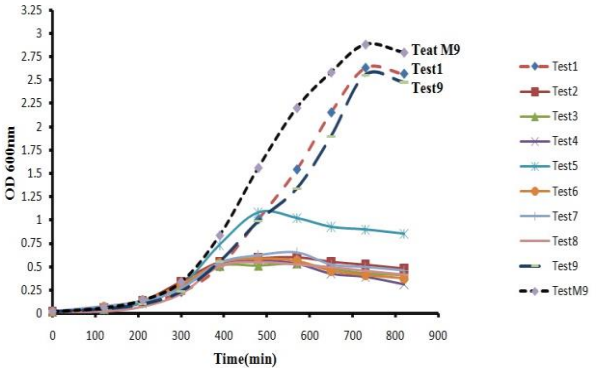
جدول ۱ آزمایشات حاصل از تاگوچی در منابع و غلظت های متفاوت کربن و نیتروژن

Sample(g/l)	Test1	Test2	Test3	Test4	Test5	Test6	Test7	Test8	Test9	Test M_9
Carbon	Glucose :8	Glucose: 9	Glucose: 10	Sucrose: 8	Sucrose: 9	Sucrose: 10	Glycerol: 8	Glycerol: 9	Glycerol: 10	Glucose: 10
Nitrogen	NH_4CL: 3	CH_4N_2O :2	$(NH_4)_2SO_4$:1	$(NH_4)_2SO_4$:3	NH_4CL: 2	CH_4N_2O: 1	CH_4N_2O: 3	$(NH_4)_2SO_4$:2	NH_4CL: 1	NH_4CL: 1

یافته ها

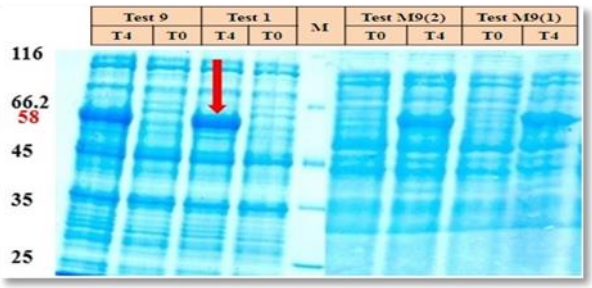
۱) غربالگری محیط کشت بوسیله تاگوچی

نمودار شکل (۱) رشد باکتری را در محیط کشت های متفاوت مطابق با جدول (۱) در کشت فلاسک نشان می دهد. بیشترین مقدار رشد سلول مربوط به محیط کشت (TestM9,Test1,Test9) می باشد.



شکل ۱: تاثیر ترکیب محیط کشت معین بر رشد سلول در غلظت ها، منابع کربن و نیتروژن متفاوت Test M9: بالاترین جذب نوری با ترکیب محیط کشت گلوکز و آمونیوم کلرید به ترتیب با غلظت (10-1g/l) Test3: کمترین جذب نوری با ترکیب محیط کشت گلوکز و آمونیوم سولفات به ترتیب با غلظت (10-1g/l)

با توجه به تجزیه و تحلیل های انجام شده با استفاده از روش تاگوچی، بیشترین تاثیر مربوط به منبع نیتروژن با ۶۷٪ می باشد. همچنین، بهترین محیط کشت بهینه شده توسط روش تاگوچی محیط کشت Test M9 انتخاب شد. در این آزمایش بالاترین مقدار ایمونوتوکسین در محیط کشت با نسبت C/N برابر ۴ به دست آمد، برای صحه گذاری آزمایش تکرار گردید.



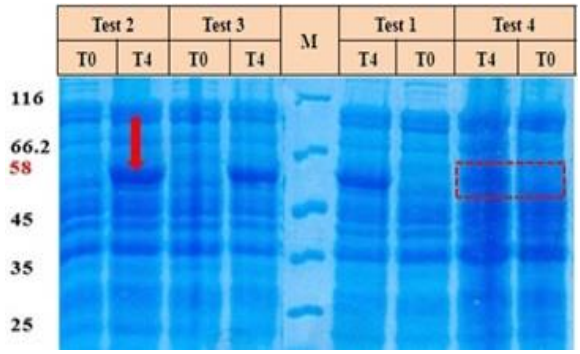
شکل ۲: بررسی محیط های کشت معین بهینه شده در غلظت ثابت اسید آمینه توسط الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، میزان Load: ۱۰ میکرولیتر در هر چاهک، T0: قبل از القاء، T4: ۴ ساعت بعد از القاء ۲) نتایج تاثیر افزودن اسید آمینه به ترکیب محیط کشت در بیان اونتاک

۲) نتایج تاثیر افزودن اسید آمینه به ترکیب محیط کشت در بیان اونتاک

در این آزمایش محیط کشت بهینه شده و همچنین محیط کشت های (Test1,Test9) که مشخص شد بیشترین میزان تولید را داشته اند، انتخاب شدند. میزان بیان نسبت به محیط کشت Test M9 ارزیابی شد. همانگونه که در شکل (۲) مشاهده می شود هنگامی که غلظت آمونیوم کلرید و گلوکز به ترتیب ۳ و ۸ گرم بر لیتر باشد بیان بهتری نسبت به محیط کشت های دیگر نشان می دهد.

۳) بررسی غلظت های متفاوت اسید آمینه

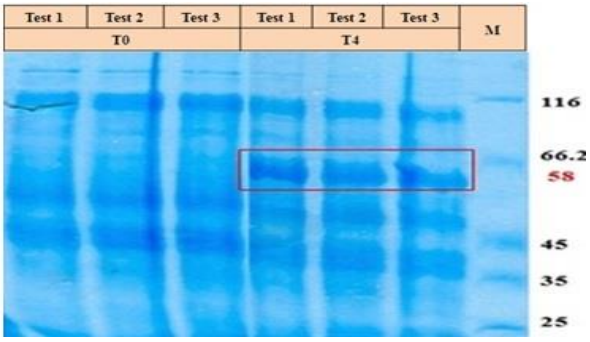
همانگونه که در شکل (۳) مشاهده می شود، هنگامی که غلظت اسید آمینه ۳ mM باشد پروتئین اونتاک نسبت به غلظت-های دیگر اسید آمینه (1,5)mM بیان بیشتری نشان می دهد. مشخصاً درصد بیان پروتئین اونتاک برای اسید آمینه با غلظت های استفاده شده در این آزمایش نسبت به محیط کشت بدون اسید آمینه (Test4) مقدار بالاتری را نشان می دهد.



شکل ۳: بررسی غلظت های متفاوت اسید آمینه در محیط کشت معین توسط الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، میزان Load: ۱۰ میکرولیتر در هر چاهک، T0: قبل از القاء، T4: ۴ ساعت بعد از القاء Test1: غلظت 1mM، Test2: غلظت 3mM، Test3: غلظت 5mM، Test4: بدون اسید آمینه

۴) بررسی زمان القاء

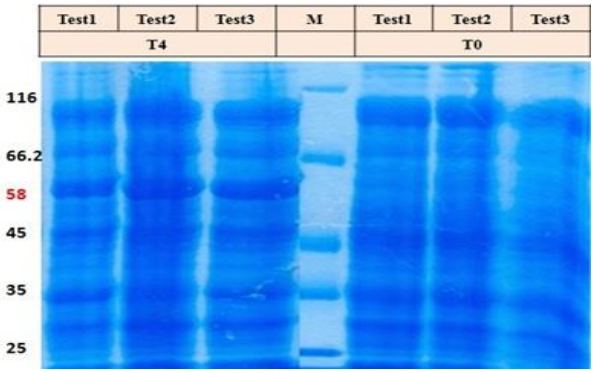
شکل (۴) تاثیر غلظت باکتری بر میزان بیان پروتئین در زمان القاء را نشان می دهد. در سه حالت ممکن مشخص شده با رنگ قرمز شرایط بیان پروتئین در زمان القاء یکسان می باشد. به منظور افزایش مقدار وزن رسوب تولیدی، $OD_{600nm}=2$ بهترین زمان القاء تعیین گردید. در یک محیط کشت با شرایط بیان یکسان، مقدار تولید وزن باکتری برای $OD_{600nm}=۲$ نسبت به $OD_{600nm}=1$ دو برابر افزایش نشان داد که می تواند از لحاظ اقتصادی قابل توجه باشد.



شکل ۴: تاثیر غلظت سلول در محیط کشت معین در بیان پروتئین اونتاک توسط الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، میزان Load: ۱۰ میکرولیتر در هر چاهک، T0: قبل از القاء، T4: ۴ ساعت بعد از القاء Test1: $OD_{600\ nm}=1.0$، Test2: $OD_{600nm}=1.5$، Test3: $OD_{600nm}=2.0$

۵) بررسی غلظت القاگر

نتایج تاثیر غلظت القاء گر IPTG بر بیان پروتئین در شکل (۵) نشان داده شده است. نتایج نشان می دهند که غلظت های زیاد IPTG، تاثیری در روند بیان پروتئین ندارد، همچنین به علت هزینه ی بالای پودر IPTG، می توان از غلظت پایین 0.1mM IPTG برای بیان این پروتئین استفاده نمود.



شکل ۵: تاثیر غلظت IPTG در محیط کشت معین در بیان پروتئین اونتاک توسط الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، میزان Load: ۱۰ میکرولیتر در هر چاهک، T0: قبل از القاء، T4: ۴ ساعت بعد از القاء Test1: IPTG=0.1mM، Test2: IPTG=0.5Mm، Test3: IPTG=1mM

بحث

در این تحقیق، با توجه به اهمیت و کاربرد پروتئین نوترکیب اونتاک در درمان انواع سرطان، بیان و تولید این پروتئین در *اشریشیاکلی* مورد توجه قرار گرفت.

در این پژوهش نوع محیط کشت به عنوان یکی از فاکتورهای بهینه سازی، به منظور فراهم کردن محیط مناسب برای رشد بهینه ی باکتری و همچنین تولید زیاد پروتئین در نظر گرفته شد. Shan و همکاران محیط کشت بهینه سازی شده را برای تولید عوامل ضد میکروبی پلی ساکارید نوترکیب از باکتری اشریشیاکلی با استفاده از روش پلاکت بورمن به دست آوردند که توانست تمام عوامل مطلوب محتوای پروتئین هدف از ۶/۱٪ (بدون بهینه سازی) به ۱۳/۲٪ افزایش دهد (۱۵).

در این تحقیق سه منبع کربن (گلوکز، ساکارز وگلیسرول) و سه منبع نیتروژن (آمونیوم کلرید، اوره و سولفات آمونیوم) با غلظت های متفاوت استفاده شد. محیط کشت Test 1 با منبع کربن گلوکز (۸ g/l) و منبع نیتروژن آمونیوم کلرید (۳ g/l) انتخاب شد. این محیط کشت به دلایل زیر به منظور افزایش توده ی سلولی و تولید زیاد پروتئین نوترکیب بکار گرفته شد: ۱) حضور گلوکز و مصرف سریع آن توسط باکتری در محیط کشت منجر به رشد سریع باکتری خواهد شد. ۲) نتایج حاصل از روش تاگوچی بیشترین سهم اجزای محیط کشت برای منبع نیتروژن آمونیوم کلرید را نشان داد. استفاده از منبع کربنی حاوی گلوکز با غلظت ۸ g/l و منبع نیتروژن آمونیوم کلرید با غلظت ۳ g/l در ترکیب محیط کشت معین اصلاح شده نسبت به محیط کشت M9 و منابع کربنی و نیتروژنی گزارش شده دیگر بیان بالاتری را نشان داد. همچنین وزن باکتری تولیدی حدود 10.9 g/l برای محیط کشت معین اصلاح شده تعیین گردید که نسبت به محیط کشت M9 به مقدار ۳ برابر افزایش نشان داد که می تواند از لحاظ اقتصادی قابل توجه باشد.

مقدار القاگر از جمله عوامل مهمی است که بر روی پروتئین نوترکیب اثر می گذارد. زمان القاء نیز از عوامل مهم در بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب می باشند چرا که بازدهی تولید پروتئین نوترکیب به نقطه ای از تابع رشد که القاء صورت می گیرد وابستگی زیادی دارد (۱۶). بررسی منحنی رشد بدون القاء و همراه با القای سویه ی نوترکیب تهیه شده نشان داد که بهترین زمان القاء در این سویه ی نوترکیب محدوده ی فاز لگاریتمی و در $OD_{600nm}=2$ است.

نتایج آزمایش ها و بهینه سازی lecina در شرایط تولید نشان داد که مقدار IPTG تاثیر زیادی بر بازدهی تولید پروتئین نوترکیب ندارد و غلظت زیاد آن باعث تولید اسید استیک در محیط کشت می شود که نهایتاً منجر به محدود شدن زمان رشد سلول می شود (۱۷). نتایجی که در این پژوهش گرفته شد نیز مشخص کننده مطالعات انجام شده بود. بنابراین به دلیل قیمت بالای IPTG و همچنین اثر سمی آن در تولید پروتئین دارویی مقدار کمتر IPTG (0.1mM) برای بیان پروتئین اونتاک پیشنهاد و انتخاب شد.

با توجه به توالی اسید آمینه به منظور افزایش بیان پروتئین می توان با افزودن اسید آمینه به محیط کشت غلظت باکتری و همچنین درصد بیان را افزایش داد. S.Y Sarkandy و همکاران مدلی را پیشنهاد کردند که با استفاده از آن و اضافه کردن اسید آمینه گلوتامین به محیط کشت توانستند درصد بیان اینترلوکین۲ را به مقدار قابل توجهی افزایش دهند (۱۸). باتوجه به شکل (۲) درصد بیان پروتئین اونتاک برای اسید آمینه با غلظت های استفاده شده نسبت به محیط کشت بدون اسید آمینه مقدار بالاتری را نشان داد. در بررسی ما با توجه به مقدار بالای جذب نوری به دست آمده ($OD_{600nm}=۴$)، افزودن اسید آمینه به محیط کشت تنها با هدف بهبود درصد بیان پروتئین اونتاک انجام شد، بدین منظور زمان های نزدیکتر به زمان القاء برای دستیابی به درصد بیان پروتئین اونتاک انتخاب گردید. نهایتا تولید در شرایط بهینه ی تعیین شده بازده پروتئین نوترکیب اونتاک را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران در پژوهشکده فناوری زیستی که ما را در این پژوهش همکاری کرده اند و از کمک هایشان دریغ ننمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می شود..

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nat Rev Drug Discov. 2008; 7:21-39.
2. Ghetie MA, Vitetta ES. Recent developments immunotoxin. Current Opinion in Immunology. 1994; 6:707-714.
3. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. Annu Rev Med. 2007; 58:221-37.
4. Zeinoddini M. Immunotoxin: The characterization and its application in protein therapy.1st. Tehran: Malek Ashtar University of Technology Press; 2011 (Persian).
5. Gelonin Immunotoxin. United States Patent 4888415. 1988.
6. Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins. Clinical Cancer Rev. 2000; 6:326-334.
7. Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. Nat Rev Cancer 2006, 6:559-565.
8. Kreitman R J, Wilson W H, Robbins D, Marguiles I, Stetler-Stevenson M, Waldmann T A, Pastan I. Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. Blood. 1999; 15:3340-8.
9. Joonseok Cho, Inbo Kim, Ju-Seong Jeong, Seung-Pil Jung, Tae-Bong Kang, and Jong-Bae Kim. Cytotoxicity of Recombinant Immunotoxin containing Lectin A chain from Korean Mistletoe. Mol Cell Toxicol. 2013; 9:29-36.
10. Manoukian G, Hagemeister F. Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. Expert Opin Biol Ther 2009; 9:1445-1451.
11. Varedi Koolaee SM, Shojaosadati SA , Babaeipour V, Ghaemi N. Physiological and Morphological Changes of Recombinant E. coli During Over-Expression of Human Interferon-g in HCDC. Iranian J. Biotechnol. 2006; 4: 230-38.
12. Collins T, Azevedo-Silva J, Costa A, Branca F, Machado R, Casal M. Batch production of a silk-elastin-like protein in E. coli BL21 (DE3): key parameters for optimization. Microbial Cell Fact. 2013; 27: 12-21.
13. Chong M, Leung R, Wong C, Yuen A. The effects of ampicillin versus tetracycline on the plasmid copy numbers of pBR322. JEMI. 2003; 3: 87-95.
14. Zeinoddini M .Theoretical and practical guide to protein analysis methods. 1st.Tehran: Malek Ashtar University of Technology Press. 2011(Persian).
15. Shan J, Mei L, Baojie W, Keyong J, Lei W. Statistical optimization of medium composition and culture condition for the production of recombinant antilipopolysaccharide factor of Eriocheir sinensis in Escherichia coli. CJOL. 2011; 29: 1249-1259.
16. Muntari B, Amid A, Mel M, Jami MS, Salleh HM. Recombinant bromelain production in Escherichia coli: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. AMB Express. 2012; 15:2-12.
17. Lecina M, , Sarro E , Casablancas A , Godia F , Cairo J. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of Escherichia coli M15 under glucose limiting conditions. Biochemical Engineering Journal. 2013; 70: 78– 83.
18. Yegane-Sarkandy S, Farnoud AM, Shojaosadati SA, Khalilzadeh R, Sadeghyzadeh M, Ranjbar B, Babaeipour V. Overproduction of human interleukin-2 in recombinant Escherichia coli BL21 high-cell-density culture by the determination and optimization of essential amino acids using a simple stoichiometric model. Biotechnol Appl Biochem. 2009; 54:31-9.
19. Amraee M. Recombinant imunotoxin design using diphtheria toxin and interleukin. MS thesis. Tehran: Malek Ashtar University of Technology. December 2013 (Persian).
20. Ranjit K R. Design of experiments using the Taguchi approach: 16 Steps to Product and Process Improvement. John Wily & Sons. 2001; ID: 0471361011. (Books).