جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

افزایش تولید اینترفرون-گامای انسانی در کشت باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب در محیط کشت شیمیایی مشخص

خلیل‌زاده رسول، شجاع‌الساداتی سیدعباس، بهرامی علی و مقصودی نادر
تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی،
دورنگار: ۸۰۰۵۰۴۰
Corresponding Author E-mail :(shoja_sa@modares.ac.ir)

چکیده

در این تحقیق، ژن اینترفرون-گامای انسانی تحت کنترل آغازگر فاژی ت-۷ در باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21(DE3) با استفاده از محیط کشت شیمیای مشخص، که در آن گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن می‌باشد، بیان شد. تاثیر افزودن اسیدهای آمینه به محیط کشت پس از القاء ، در میزان بازدهی ویژه و بهره‌دهی کلی محصول بررسی شد. افزودن چهار اسید امینه گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین و فنیل‌آلانین به محیط کشت پس از القاء، بازدهی ویژه و بهره‌دهی کلی تولید اینترفرون-گامای انسانی به ترتیب بیش از دو و سه برابر افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیا کلی* نوترکیب؛ محیط کشت شیمیایی مشخص؛ اسیدآمینه؛ استوکیومتری واکنش‌های بیوشیمیای؛ اینترفرون-گامای انسانی.

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) میزبان مناسبی است که بیشترین کاربرد را در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارد و به عنوان یک میکروارگانیسم ایمن برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب شناخته می‌شود و اطلاعات زیادی در مورد خصوصیات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن در دست‌است[۱و۲]. پروتئین‌های زیادی از قبیل اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، فاکتورهای محرکه کلونی، هورمون رشد، فاکتورهای رشدی شبه-انسولین و آلبومین سرم انسانی بطور موفقیت آمیزی با استفاده از این باکتری تولید شده‌اندکه اکثر این پروتئین‌ها به صورت توده‌های درون سلولی غیرمحلول (inclusion body)در داخل سلول انباشته می‌شوند[۲و۳]. هدف نهایی بهینه‌سازی فرایندهای تخمیری افزایش بهره‌دهی کلی (overall productivity) است و مفهوم آن تولید بیشترین میزان محصول در واحد حجم در کمترین زمان ممکن می‌باشد. افزایش بهره‌دهی کلی محصولاتی که به صورت درون سلولی تولید می‌شوند هم با افزایش غلظت توده سلولی(cell density) و هم با افزایش بازدهی ویژهٔ تولید محصول (specific yield) و یا افزایش هر دو با هم مقدور می‌باشد[٤و٥]. اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه بهینه‌سازی فرایند تخمیر پروتئین‌های نوترکیب، بر روی افزایش تراکم سلولی متمرکز شده است و توجه کمتری به افزایش بازدهی‌ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب (میزان پروتئین نوترکیب تولیدشده به ازای واحد جرم تودهٔسلولی) شده‌است. علاوه بر این، معمولاً با افزایش تراکم سلولی بازدهی‌ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب کاهش‌می‌یابد[٦-۹]. برای رسیدن به بهره‌دهی کلی بالا ضروری است که بازدهی‌ویژه تولید پروتئین نوترکیب همزمان با افزایش غلظت تودهٔسلولی در حد مطلوبی حفظ شود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهار راهکار کلی برای بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های نوترکیب شامل انتخاب ترکیب محیط کشت، بهبود شیوه کشت، اصلاح وبهبود سویه میزبان وکنترل سیستم‌های بیانی است[۲و۱۰]. بیشترین تلاش‌ها برای افزایش بهره‌دهی کلی تولید پروتئین‌های نوترکیب در سویه‌های باکتریای در جهت افزایش غلظت تودهٔسلولی صورت گرفته است واهمیت کمتری به بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت به منظور افزایش بازدهی‌ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب داده شده‌است.

بر اساس طبیعت مواد بکار رفته در ترکیب محیط‌کشت‌ها، آنها را به دو دسته محیط‌کشت‌های شیمیایی مشخص (chemically defined medium) یا سنتتیک (synthetic medium) و محیط‌کشت‌های غیرمشخص یا پیچیده(undefined or complex medium) طبقه‌بندی می‌کنند. در محیط‌کشت‌های شیمیایی مشخص ترکیب شیمیایی و غلظت مواد مغذی (nutrients) کاملاً مشخص می‌باشد ولی در مقابل ترکیب شیمیایی و کیفیت محیط کشت‌های پیچیده متغیر است که این عامل موجب کاهش تکرارپذیری فرایندهای تخمیری انجام شده با محیط‌های پیچیده می‌شود. استفاده از محیط کشت‌های شیمیایی مشخص دارای مزایای متعددی نسبت به محیط کشت‌های پیچیده می‌باشد که از آن جمله می‌توان به افزایش تکرارپذیری و ثبات فرایند تخمیر، اندازه‌گیری و کنترل (monitoring and control) بهتر شرایط تخمیر، بهبود عملیات افزایش مقیاس(scale up)، بهبود فرایندهای پایین‌دستی (down stream process) و خالص سازی محصول، و مطابقت داشتن با قوانین و مقررات GMP اشاره کرد[۲، ٤، ٥ و ۱۱].

با وجود مزایای فوق برای محیط کشت‌های شیمیایی مشخص، بازدهی‌ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب در این محیط‌ها عموماً کمتر از محیط‌کشت‌های پیچیده است و علیرغم اینکه اهمیت ترکیب محیط کشت در تولید فرآورده‌های سلولی بخوبی روشن می‌باشد ولی گزارشات کمی در مورد بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت به منظور افزایش بازدهی ویژه تولید پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد.

در این تحقیق اثر افزودن چند اسیدآمینه به محیط کشت، پس از عمل القاء در افزایش بازدهی ویژه تولید اینترفرون-گامای انسانی بررسی شد و برای انتخاب نوع ومیزان اسیدهای آمینه از استوکیومتری(stoichiometry) واکنش‌های بیوشیمیای تولید اینترفرون-گامای انسانی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

ارگانیسم استفاده شده باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21(DE3) است. باکتری نوترکیب در فریزر ۷۰°C – در ۲۰ درصد حجمی گلیسرول نگهداری می‌شد[٥]. برای کشت اولیه باکتری از محیط کشت پیچیده LB آگارحاوی ۱۰۰میلی‌گرم آمپی‌سیلین بر لیتر استفاده شد.

تجهیزات

برای انجام کشت‌ها از فرمنتور آزمایشگاهی ۲ لیتری مجهز به سیستم‌های کنترل دما، اکسیژن محلول، pH و کف با حجم کاری یک لیتر استفاده‌شد.

محیط کشت

محیط کشتLB آگار حاوی ۱۰ گرم بر لیتر تریپتون، ٥ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ٥ گرم بر لیتر NaCl و ٪۱/٥ آگار برای کشت باکتری در بشقابک در دار (plate) استفاده شد.

محیط کشت شیمیایی مشخص اصلاح شده M9 حاوی ۱۰ گرم برلیترگلوکز، ۸/ ۱۲گرم بر لیتر $Na_2HPO_4,7H_2O$، ۳ گرم بر لیترKH_2PO_4، ۰/٥ گرم بر لیتر NaCl، ۱۰ گرم بر لیتر NH_4Cl ، ۰/۲٤ گرم بر لیتر $MgSO_4$ و ۱ میلی‌لیتر از محلول عناصر کم مقدار(trace elements) با ترکیب زیر برای کشت غیرمداوم باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* استفاده شد.

ترکیب محلول عناصر کم مقدار: ۲/۷٥ گرم بر لیتر $FeSO_4,7H_2O$ ، ۱/۹۸ گرم بر لیتر $MnCl_2,4H_2O$ ، ۲/۸۱ گرم بر لیتر $CoSO_4,7H_2O$، ۱/٤۷ گرم بر لیتر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

$CaCl_2,2H_2O$ ، ۰/۱۷ گرم بر لیتر $CuCl_2,2H_2O$ و ۰/۲۹ گرم بر لیتر $ZnSO_4,7H_2O$ در HCl یک نرمال.

آنالیزها

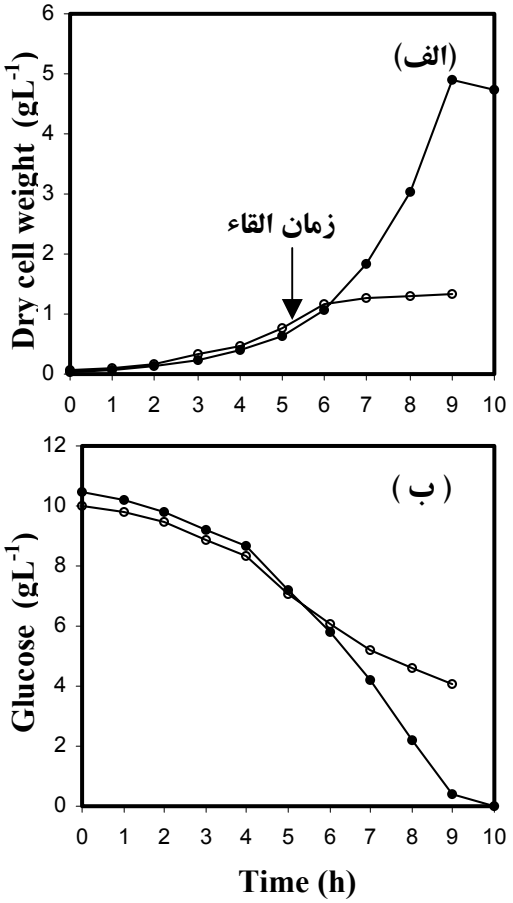
تراکم‌سلولی با اندازه‌گیری جذب نوری محیط‌تخمیر (OD) در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد. برای این منظور نمونه‌های محیط کشت با مقدار مناسبی از محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد برای بدست آوردن جذب نوری بین ۰/۲ تا ۰/۷ رقیق می‌شدند. از یک منحنی استاندارد برای تبدیل OD_{600} به وزن خشک استفاده شد. برای تعیین وزن خشک، ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت سانتریفوژ شده (۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و دوبار با آب مقطر شستشو داده می‌شد. سپس توده سلولی در دمای ۱۰۵ °C تا رسیدن به وزن‌ثابت خشک می‌شد. برای سنجش گلوکز از کیت‌آنزیمی استفاده شد. میزان اینترفرون ـ گاما با انجام الکتروفورز و استفاده از روش دانسیتومتری تعیین شد.

نتایج و بحث

منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* در محیط کشت شیمیایی مشخص با وبدون القاء در شکل-۱ آورده شده است. برای القاء ، از غلظت نیم میلی مولار ایزوپروپیل بتا-د-تیوگالاکتو پیرانوزید (IPTG) استفاده شد. نتایج حاصل نشان‌می‌دهد که القاء رشد باکتری را مهار می‌کند مهار رشد باکتری در اثر القاء به دلیل تولید محصول خارجی در سلول میزبان رخ می‌دهد که با نتایج سایر محققان نیز مطابقت دارد[۶، ۸، ۹ و ۱۲].

بازدهی ویژه تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب (rhIFN-γ) که عبارت است از اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب تولید شده بر واحد جرم توده سلولی خشک، در محیط کشت شیمیایی مشخص در شرایط فوق چهار ساعت بعد از القاء حدود **130 mg $_{rhIFN-\gamma}$ /g $_{dry\ cell\ weight}$** است که در مقایسه با محیط کشت پیچیده کمتر می‌باشد[۹].

اسید آمینه‌ها را بر اساس مسیرهای بیوشیمیایی بیوسنتزی آنها به پنج خانواده تقسیم می‌کنند.درصد فراوانی اسید آمینه‌های اینترفرون-گامای انسانی در جدول-۱ آورده شده است. حدود ۴۰درصد اسید آمینه‌های اینترفرون-گامای انسانی را اسید آمینه‌های خانواده آسپارتیک اسید تشکیل می‌دهند که در بین آنها اسید آمینهٔ لیزین با ۱۴ درصد و اسید آمینه‌های آسپارژین وآسپارتیک اسید هر کدام با ۷ درصد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. اسید آمینهٔ آسپارژین طی یک واکنش آمیناسیون از اسیدآمینه آسپارتیک اسید ساخته می‌شود. بنابراین از اسید آمینه‌های این گروه اسید آمینه‌های لیزین و آسپارتیک اسید برای افزودن به محیط کشت انتخاب شدند.



شکل-۱. (الف) منحنی رشد و (ب) مصرف گلوکز باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* در محیط کشت شیمیایی مشخص. (●) بدون القاء و (○) با القاء.

اسید آمینه‌های خانواده گلوتامیک اسید نیز حدود ۲۰درصد از اسید آمینه‌های اینترفرون-گامای انسانی را تشکیل می‌دهند

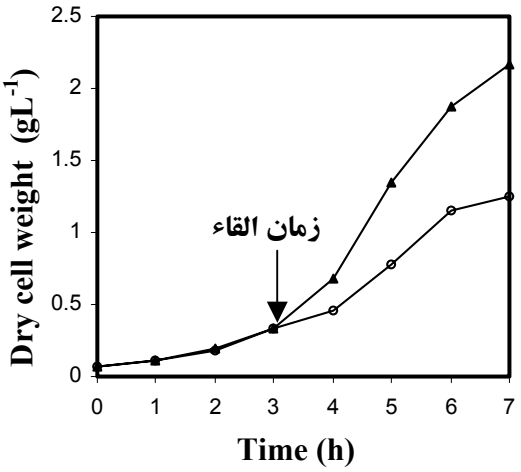
که در بین آنها اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید وگلوتامین مجموعاً با حدود ۱۳ درصد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند.

جدول-۱. درصد فراوانی اسیدهای آمینه در اینترفرون-گامای انسانی

نام اسید آمینه	علامت اختصاری	تعداد	درصد فراوانی(٪)
۱- خانوادهٔ پیرووات		۱٦	۱۱,۳
سرین	S	۱۱	۷,۷
گلی‌سین	G	۵	۳,۵
سیستئین	C	۰	۰
۲- خانوادهٔ ۳-فسفوگلیسرات		۲٦	۱۸,۳
آلانین	A	۸	۵,٦
والین	V	۸	۵,٦
لوسین	L	۱۰	۷
۳- خانوادهٔ گلوتامیک اسید		۲۸	۱۹,۷
گلوتامیک اسید	E	۹	٦,۳
گلوتامین	Q	۹	٦,۳
پرولین	P	۲	۱,٤
آرژنین	R	۸	۵,٦
٤- خانوادهٔ آسپارتیک اسید		۵٦	۳۹,٤
آسپارتیک اسید	D	۱۰	۷
آسپارژین	N	۱۰	۷
لیزین	K	۲۰	۱٤,۱
متیونین	M	٤	۲,۸
تره‌ئونین	T	۵	۳,۵
ایزولوسین	I	۷	٤,۹
۵- خانوادهٔاسیدآمینه‌های حلقوی		۱٦	۱۱,۳
فنیل‌آلانین	F	۱۰	۷
تیروزین	Y	۳	۲,۱
تریپتوفان	W	۱	۰,۷
هیستیدین	H	۲	۱,٤

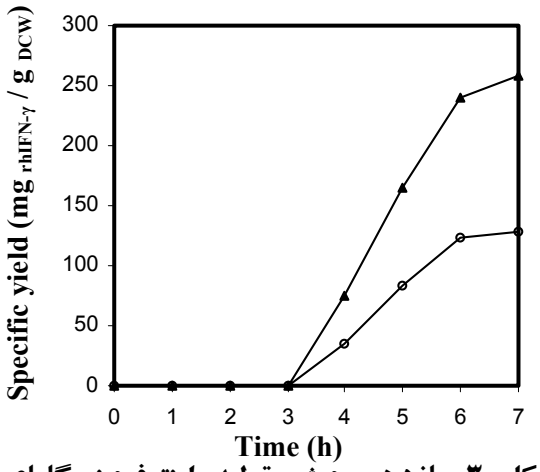
اسید آمینهٔ گلوتامین طی یک واکنش آمیناسیون از گلوتامیک اسید ساخته می‌شود. بنابراین از اسید آمینه‌های این گروه گلوتامیک اسید برای افزودن به محیط کشت انتخاب شد. از خانوادهٔ اسید آمینه‌های حلقوی که شامل اسید آمینه‌های فنیل‌آلانین، تیروزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد، اسیدآمینهٔ فنیل‌آلانین که با حدود ۷ درصد در صدر گروه قرار دارد برای افزودن به محیط کشت انتخاب شد.

اسید آمینه‌های خانوادهٔ پیرووات (آلانین، والین و لوسین) و ۳-فسفوگلیسرات (سرین، گلی‌سین و سیستئین) که به ترتیب حدود ۱۸ و ۲۱ درصد از اسید آمینه‌های اینترفرون-گامای انسانی را تشکیل می‌دهند، دارای مسیرهای بیوسنتزی کوتاهتری هستند و از مواد حدواسط مسیر EMP تولید می‌شوند، بنابراین از افزودن آنها به محیط کشت صرف نظر شد. مقادیر اسید آمینه‌های انتخاب شده با فرض اینکه بعد از القاء تولید تودهٔ سلولی ناچیز می‌باشد و اسید آمینه‌های اضافه شده فقط صرف سنتز اینترفرون-گامای انسانی می‌شوند، با توجه به موازنه جرم تولید اینترفرون-گامای انسانی محاسبه شد.



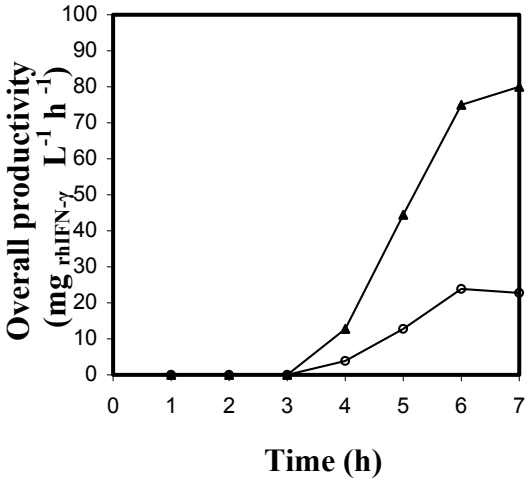
شکل-۲. منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* در محیط کشت شیمیایی مشخص. (○) بدون افزودن اسیدهای آمینه و (▲) با افزودن اسیدهای آمینهٔ گلوتامیک اسید، لیزین، آسپارتیک اسید و فنیل‌آلانین پس از القاء.

تأثیر افزودن اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین و فنیل‌آلانین به ترتیب با مقادیر ۰٫۱، ۰٫۱، ۰٫۰۷ و ۰٫۰۵ گرم بر لیتر به محیط کشت شیمیای مشخص پس از القاء در منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب در شکل-۲ آورده شده است. مقایسه نتیجه حاصل با منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب در محیط کشت شیمیای مشخص بدون افزودن اسید آمینه‌ها نشان می‌دهد که افزودن اسید آمینه‌های فوق موجب کاهش اثر سمی IPTG می‌شود و غلظت تودهٔسلولی را تا حدود دو برابر افزایش می‌دهد.



شکل-۳. بازدهی ویژه تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلی* حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* در محیط کشت شیمیایی مشخص. (○) بدون افزودن اسیدهای آمینه و (▲) با افزودن اسیدهای آمینهٔ گلوتامیک اسید، لیزین، آسپارتیک اسید و فنیل‌آلانین پس از القاء.

تأثیر افزودن اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین و فنیل‌آلانین در بازدهی ویژه و بهره‌دهی کلی تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب در محیط کشت شیمیایی مشخص با حالتی که اسیدآمینه‌ای به محیط کشت افزوده نشده است در شکل-۳و٤ مقایسه شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بازدهی ویژه تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب در محیط کشت شیمیایی مشخص چهار ساعت بعد از القاء در اثر افزودن اسید آمینه‌های فوق به حدود **260 mg** $_{rhIFN-\gamma}$ **/g** $_{dry\ cell\ weight}$ می‌رسد که حدود دو برابر افزایش نشان می‌دهد.



شکل-٤. بهره‌دهی کلی تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلی* حاوی پلاسمید بیانی pET3a-*hIFN-γ* در محیط کشت شیمیایی مشخص. (○) بدون افزودن اسیدهای آمینه و (▲) با افزودن اسیدهای آمینهٔ گلوتامیک اسید، لیزین، آسپارتیک اسید و فنیل‌آلانین پس از القاء.

بهره‌دهی کلی تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب در اثر افزودن اسید آمینه‌ها به محیط کشت شیمیایی مشخص پس از القاء به حدود **80 mg** $_{rhIFN-\gamma}$ L^{-1} h^{-1} می‌رسد که حدود سه و نیم برابر افزایش نشان می‌دهد. با توجه به مزایای متعدد محیط‌کشت‌های شیمیایی مشخص در تولید محصولات دارویی نوترکیب در مقایسه با محیط‌کشت‌های پیچیده و با توجه به نتایج حاصل، محیط‌کشت فوق می‌تواند جایگزین مناسبی برای محیط‌کشت‌های پیچیده در تولید اینترفرون-گامای انسانی نوترکیب باشد.

تشکر وقدردانی

بدین وسیله از موسسهٔ آموزشی و تحقیقاتی نور و شرکت آنتی بیوتیک‌سازی شفای ساری تشکر وقدردانی می شود.

منابع

1. Riesenberg, D. and Guthke, R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:422-430.
2. Lee, S. Y. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trend. Biotechnol., Vol:14, pp 98-105.
3. Zhang, X. W., Sun, T., Liu, X., Gu, D. X. and Huang, X. N. 1998. Human growth hormone production by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli.* Process Biochemistry, Vol. 33, No.6, pp. 683-686.
4. Yee L., Blanch H, W., " Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli*" Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, p. 221-230, 1993.
5. Rothen S. A., Sauer M., Sonnleitner B., Witholt B., "Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101[pGEc47] on defined medium" Biotechnology and Bioengineering, Vol. 58, No. 1, p. 92-100, 1998.
6. Panda A. K., Khan R. H., Appa Rao K. B. C., Totey S. M., "Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone" J. of Biotechnology, Vol. 75, p. 161-172, 1999.
7. خلیل‌زاده ر.، بهرامی ع.، بابایی‌پور و.، مقصودی ن. و شجاع‌الساداتی س. ع.، " کشت با تراکم سلولی بالای باکتری اشریشیا کلی برای تولید اینترفرون-گاما" هفتمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، جلد ۵: ۱۵-۱۹، آبان ۱۳۸۱.
8. بهرامی ع.، بابایی‌پور و.، خلیل‌زاده ر.، مقصودی ن.، "بررسی اثر القاء در فرایند تخمیر پروتئین نوترکیب G-CSF با فرمنتور همزن‌دار" هفتمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، جلد ۵: ۸۹-۹۳، آبان ۱۳۸۱.
9. بابایی‌پور و.، خلیل‌زاده ر.، بهرامی ع.، مقصودی ن.، "بهینه‌سازی محیط کشت پیچیده و شرایط القاء در تولید پروتئین نوترکیب اینترفرون-گامای انسانی در فرمنتور همزن‌دار ناپیوسته" هفتمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، جلد ۵: ۱۰۱-۱۰۶، آبان ۱۳۸۱.
10. Kleman G. L., Strohl W. R., "Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation" Current Biology, Vol. 5, p. 180-186, 1994.
11. Zhang J., Greasham R., " Chemically defined media for commericial fermentations" Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 51, p422-430, 1999.
12. Miao F., Kompala D. S., "Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling" Biotechnology and Bioengineering, Vol. 40, p. 787-796, 1992.