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

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

اثر شرايط القاء و خوراكدهي پس از القاء روي رشد اشريشياكلي نوتركيب و توليد اينترفرون گاماي انساني

بابايي‌پور وليا... [۱و۲*]، شجاع‌الساداتي سيدعباس [۲**]، خليل‌زاده رسول [۱]
۱. تهران، دانشگاه صنعتي مالك اشتر، مجتمع علوم كاربردي،مركز آموزشي و تحقيقاتي علوم و فن‌آوري زيستي،گروه مهندسي بيوشيمي
۲. تهران، دانشگاه تربيت مدرس، دانشكده فني مهندسي، بخش مهندسي بيوشيمي، گروه بيوتكنولوژي، دورنگار ۸۰۰۵۰٤۰
E-mail: shoja_sa@modares.ac.ir , babaeipour@modares.ac.ir

چكيده
توسعه محيط كشت ساده و كم‌هزينه و فراهم كردن شرايط مناسب القاء توليد پروتئين‌هاي نوتركيب همواره مورد توجه صنعت مي‌باشد. از اينرو در اين تحقيق سعي شد براساس تركيب شيميايي و روابط استوكيومتري سنتز اينترفرون گاماي انساني و اشريشياكلي نوتركيب ساده‌ترين محيط كشت ممكن و بهترين شرايط القاء بدست آيد. براي اين منظور اثر خوراكدهي بعد القاء و شرايط القاء روي توليد اينترفرون گاماي انساني از كشت غيرمداوم اشريشاكلي سويه BL21(DE3) در محيط كشت ساده M9 بررسي شد. در اين رابطه اثر افزودن اسيدهاي آمينه(شامل اسيد هاي آمينه گلوتاميك اسيد ، اسپارتيك اسيد ، ليزين، فنيل آلانين)، دانسيته سلولي در زمان القاء، نوع و مقدار القاءگر با استفاده از طراحي آزمايشهاي تاگوچي بررسي شد و نهايتاً در شرايط بهينه وزن خشك نهايي ۵/۵ g/lit با درصد بيان ٦۰-۵۵ % و بهره‌دهي كلي توليد اينترفرون گاما ۱٦۰ mg/L.h بدست آمد.
واژه‌هاي كليدي: اينترفرون گاما انساني، شرايط القاء، خوراكدهي بعد القاء، اشريشياكلي نوتركيب

The effect of induction condition and post-induction feeding on the production of human Interferon -γ in *Escherichia coli*

Babaeipour V. [1]*, Shojaossadati S.A.[2], Khalilzadeh R. [1]**

1– Department of Biochemical Engineering, Biotechnology Research Center, Maleke Ashtar University, Tehran.
2-Biotechnology Group, Department of chemical engineering,Faculty of engineering,, Tarbiat modarres university, Tehran, Iran(Fax:09821/8005040; ** Coressponding Author E.mail: shoja_sa@modares.ac.ir)

ABSTRACT
Development of inexpensive and simple medium culture and appropriate induction conditions always is favorable for industry. In this research by using the chemical composition and stoichiometric data for Interferon-γ production and recombinant *E.coli* growth, the simpl medium and the favorable induction conditions was obtained. To achieve this goal the effects of medium composition and induction conditions under batch culture of E.coli BL21 (DE3-pET3a-INFγ) in medium M9 on Interferon-γ production was investigated. Taguchi experimental design was used to optimize the addition of adding amino acids (including glutamic acid, aspartic acid, lysine, and phenylalanine), induction time, and amount and type inducer by were investigated. According to results of optimized conditions, cell dry weight 5.5g/L with expression percent 55-60%, and overall Interferon-γ productivity 160±5 mg/L.h, were obtained.
Keywords: Interferon-γ, Induction condition, post-induction feeding, culture media, optimization

مقدمه
باكتري اشريشياكلي بدليل شناخته‌تر بودن خواص فيزيولوژيكي، بيوشيميايي و ژنتيكي نسبت به ديگر ميكروارگانيسم‌ها، رايجترين ميزبان براي توليد پروتئين‌هاي نوتركيب است[Baneyx ۱۹۹۹، Macdonald ۱۹۹۰]. توسعه موفق و اقتصادي فرآيندهاي توليد پروتئين‌هاي نوتركيب در اشريشياكلي مستلزم دستيابي به بالاترين بهره‌دهي كلي توليد پروتئين مي‌باشد. بهينه‌سازي محيط كشت در فرمانتور ناپيوسته، معمولترين و ساده‌ترين روش افزايش بهره‌دهي كلي توليد پروتئين‌هاي نوتركيب است و غالباً مي‌توان با محيط كشت‌هاي پيچيده مثل كازامينواسيدها، پپتون و يا عصاره مخمر توليد پروتئين‌هاي نوتركيب را در مقياس آزمايشگاهي بطور قابل توجهي افزايش داد[Galindo ۱۹۹۰، Rinzema ۱۹۹٦]. ولي بهرحال استفاده از محيط كشت‌هاي پيچيده بدليل مشكل كردن فرآيندهاي پايين‌دستي و بالطبع افزايش هزينه‌هاي توليد و همچنين كاهش تكرارپذيري فرآيند و عدم تطابق با قوانين GMP اين روش مورد توجه صنعت نيست. لذا استفاده از محيط كشت‌هاي ساده بهمراه يك يا چند اسيدآمينه براي رسيدن به بهره‌دهي بالاتر سلول و پروتئين نوتركيب براي صنعت جذاب‌تر است. متأسفانه اطلاعات كمي در اين زمينه وجود دارد [Broedel ۱۹۹٦، Donovan ۱۹۹٦]. ولي تحقيقات انجام شده نقش موثر شرايط القاء و افزودن اسيدهاي آمينه خاص روي توليد پروتئين‌هاي نوتركيب را نشان مي‌دهد[بابايي پور۱۳۸۱،خليل زاده ۱۳۸۲]. براي همين منظور اثرات شرايط القاء و افزودن اسيدهاي آمينه گلوتاميك اسيد، اسپارتيك اسيد ، ليزين و فنيل آلانين در زمان القاء (بر اساس تركيب شيميايي و مسيرهاي بيوشيميايي پروتئين نوتركيب و اشريشياكلي) روي بهره‌دهي كلي توليد اينترفرون گاماي انساني در كشت غيرمداوم اشريشياكلي نوتركيب بررسي شد. جهت بررسي عوامل مورد نظر از روش آماري تاگوچي، كه امكان بررسي همزمان عوامل مورد نظر بهمراه اندركنش بين آنها و با انجام كمترين تعداد آزمايشها را فراهم مي‌كند، استفاده شد.

مواد و روشها:
ميكروارگانيسم: باكتري اشريشياكلي سويه BL21(DE3) بعنوان ميزبان براي بيان ژن اينترفرون گاماي انساني استفاده شد. اين سويه با پلاسميد القايي pET3a (شركت Novagen) كه ژن اينترفرون گاما (شركت آموزشي تحقيقاتي نور) بداخل مكان‌هاي برش NdeI و NotI وارد شده با استفاده از كلريد كلسيم ترانسفورم شد. سلول‌هاي ترانسفورم شده روي چند پليت LB آگار حاوي 100 mg/l آمپي‌سيلين كشت داده شد.
محيط‌هاي كشت و محلول‌ها: محيط كشت LB آگار براي كشت ميكروارگانيسم روي پليت‌ها، محيط كشت M9 شامل: گلوكز 10 g/l، Na_2HPO_4 6 g/l، KH_2PO_4 3 g/l، NH_4Cl 1g/l، NaCl 0.5g/l، $MgSO_4$ 0.12 g/l براي تهيه محيط كشت مايه تلقيح و تخمير هاي غيرمداوم استفاده شد.

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

محلول 0.1 M در آب اسيدهاي آمينه فنيل آلانين و ليزين و محلول 1 M در اسيدكلريدريك اسيدهاي آمينه گلوتاميك اسيد و اسپارتيك اسيد براي بررسي اثر افزودن اسيدهاي آمينه و محلول 0.5 M لاكتوز و ايزوپروپيل- بتا-د-تيوگالاكتوپيرانوزايد (IPTG) 0.1 M براي بررسي اثر القاء استفاده شد.

تجهيزات: فرمنتور آزمايشگاهي ۳/٦ ليتري (INFORS) مجهز به سيستم‌هاي كنترل دما، اكسيژن محلول، pH و كف با حجم كاري ۲ ليتر براي انجام كشت‌هاي غيرمداوم استفاده شد.

آنالیزها: تراكم سلولي با اندازه‌گيري جذب نوري محيط تخمير (OD) در طول موج nm ٦۰۰ اندازه‌گيري شد. از يك منحني استاندارد براي تبديل OD_{600} به وزن خشك استفاده شد. براي تعيين وزن خشك ٥ ميلي‌ليتر محيط كشت سانتريفوژ شده (۹۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۱۰ دقيقه) و دو بار با آب مقطر شستشو داده مي‌شد. سپس توده سلولي در دماي $105^{\circ}c$ تا رسيدن به وزن ثابت خشك مي‌شد. براي سنجش گلوكز از كيت آنزيمي استفاده شد. ميزان اينترفرون گاما با انجام الكتروفورز روي ژل SDS-PAGE ۱۲/٥% پلي‌آكريل آميد وبا استفاده از روش دانسيتومتري تعيين شد و پروتئين كل نيز با روش برادفورد اندازه‌گيري شد.

روش انجام آزمايش: براي بررسي اثر افزودن اسيدهاي آمينه و شرايط القاء از روش آماري تاگوچي جهت طراحي آزمايش‌ها، آناليز و پيش‌بيني نتايج استفاده شد. با اين روش تاثير چهار عامل غلظت محلول اسيدهاي آمينه، مقدار القاءگرهاي IPTG و لاكتوز و زمان القاء در سه سطح بررسي شد (جدول ۱) . براي اندازه گيري ميزان بيان و بهره‌دهي كلي توليد پروتئين از سه ساعت قبل و چهار ساعت بعداز القاء هر ساعت نمونه گيري انجام شد.

نتايج و بحث: با توجه به اينكه چهار عامل در سه سطح گرفته شده بود براساس روش طراحي آماري تاگوچي از آرايه متعامد L_9 استفاده شد (جدول ۲) و ۹ آزمايش دو بار تكرار شد. منحني تغييرات استات، گلوكز، OD_{600}، وزن خشك و ميزان بيان و همچنين بهره‌دهي كلي هر آزمايش تعيين شد و نهايتاً بهره‌دهي كلي بعنوان معيار مقايسه نتايج آزمايش‌ها استفاده شد. و سپس با آناليز واريانس داده‌ها به كمك نرم‌افزار طراحي آماري تاگوچي (Qualitek-4) مقادير بهينه عوامل مورد بررسي بدست آمد و مقدار بيشينه بهره‌دهي كلي توليد اينترفرون گاما پيش‌بيني و با آزمايش تاييد شد(جدول-۳) .

اسيد هاي آمينه را بر اساس مسيرهاي بيوشيميايي بيوسنتزي آنها به پنج گروه تقسيم مي كنند. تركيب اسيدهاي آمينه اينترفرون گاما شامل: ٤۰% اسيدهاي آمينه خانواده اسيد اسپارتيك، ۲۰%گروه اسيد گلوتاميك، ۱٦% اسيد آمينه هاي حلقوي، اسيد آمينه هاي خانواده پيروات و ۳-فسفوگليسرات به ترتيب ۱۸و۲۱% مي باشد. كه در بين آنها اسيد آمينه هاي ليزين و آسپارتيك اسيد ، گلوتاميك اسيد ، فنيل آلانين بدليل داشتن سهم بيشتر در تركيب اينترفرون گاما انتخاب شدند.اسيد آمينه هاي خانواده پيروات (آلانين، والين و لوسين) و ۳-فسفوگليسرات (سرين، گليسين و سيستئين)به ترتيب ۱۸و۲۱% بدليل اينكه از مواد حد واسط مسير گليكوليز توليد مي شوند از افزودن آنها به محيط كشت صرفنظر شد.مقادير اسيدهاي آمينه انتخاب شده(اسيد گلوتاميك، ليزين، اسيد اسپارتيك و فنيل آلانين) با فرض اينكه توليد آنها بعد از القاء براي سنتز پرونئين كافي نبوده و بالطبع باعث كاهش شديد رشد باكتري و توليد پروتئين نيز مي شود، و اسيدهاي آمينه اضافه شده فقط صرف سنتز اينترفرون گاماي انساني ميشود، با توجه به موازنه جرم توليد اينترفرون گاماي انساني محاسبه شد.

نتايج آزمايشات (جدول-۳) نشان مي‌دهد كه زمان القاء، بدليل تاثير زيادي كه روي دانسيته سلولي نهايي دارد،روي بهره دهي كلي توليد پروتئين خيلي موثر است و همانطور كه ملاحظه مي‌شود در سطح سوم يعني اواسط فاز لگاريتمي بهينه است. انجام آزمايش در مقادير بالاتر تاثير چنداني روي مقدار بهينه نداشت.

نوع القاگر تاثير زيادي روي توليد پروتئين ندارد، ولي بهرحال استفاده از القاگر با قيمت پايين تر و با كارايي برابر همواره مورد توجه محققين است.،كه در اين تحقيق نيز با استفاده از لاكتوز اين مهم فراهم شده است.

مقدار القاگر نيز تاثير زيادي روي توليد اينترفرون دارد. و همانطوركه نتايج اين تحقيق نشان مي دهد براي دستيابي به بيان بيشينه لازم است مقدار آن بهينه شود.چرا كه مقدار زيادتر آن تنها باعث كاهش ارزش اقتصادي پروتئين نوتركيب مي شود.

افزودن اسيدهاي آمينه تاثير قابل توجهي روي دانسيته سلولي نهايي، مقدار بيان و بالطبع بهره دهي كلي توليد اينترفرون گاما دارد . ولي بهرحال در افزودن اسيدهاي آمينه موردنظر لازم است به دونكته مهم ۱) مقدار مجاز غلظت اسيد آمينه در محيط كشت (كه بالاتر از آن براي ميكروارگانيسم ايجاد سميت ميكند)، ۲) توازن بين هزينه مصرف اسيدهاي آمينه و ارزش اقتصادي حاصل از افزايش بهره وري توليد، توجه شود. در تحقيق مزبور نيز سعي شده دستيابي به مقادير بهينه با لحاظ كردن اين موارد صورت گيرد.

مراجع

۱. بابايي‌پور ولي‌الله، خليل‌زاده رسول، بهرامي علي و مقصودي نادر (۱۳۸۱) بهينه‌سازي محيط كشت پيچيده و شرايط القاء در توليد پروتئين نوتركيب اينترفرون-گاماي انساني در فرمنتور همزن‌دار ناپيوسته. هفتمين كنگره ملي مهندسي شيمي ايران، جلد ٥: ۱۰٦-۱۰۱.
۲. خليل‌زاده رسول، شجاع السادتي سيد عباس، بهرامي علي و مقصودي نادر (۱۳۸۲) مقايسه محيط كشت شيميايي مشخص و پيچيده در كشت باكتري *اشريشيا كلي* نوتركيب براي توليد اينترفرون-گاماي انساني. هشتمين كنگره ملي مهندسي شيمي ايران، دانشگاه فردوسي مشهد، ص ۱۳٦.
3. Baneyx F., (1999), Recombinant protein expression in Escherichia coli", Current opinion in Biotechnology, Vol.10, p.411-421.
4. Broedel S.E., Papciak S.M., Jones W.R.,(2001), The Selection of Recombinant Media Formulations for Improved Expression of Recombinant proteins in E.coli, Technical Bulletin-Athena Enzyme System Group,Vol.2,P.1-6.
5. Donovan R.S., Robinson C.W., Glick B.R.,(1996), Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the Lac promoter ,Journal of Industrial Microbiology, Vol16, p.145-154.
6. Galindo E., Bolivar F., Quintro R., (1990), Maximizing the Expression of Recombinant Protein in Escherichia coli by Manipulation of Culture Conditions, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.69, No.3, p.159-165.

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

7. Macdonald H.L., Neway J., (1990),” Effects of Medium Quality on the Expression of Human Intrelukin-2 at High Cell Density in Fermentor Cutures of Escherichia coli K-12”, Applied and Environmental Microbiology, p.640-645.
8. Rinzema Z.Y., Tramper A., (1996), Medium Design Based on Stoichiometric Analysis of Microbial Transglutaminase production by Streptoverticillium Mobaraense, Biotechnol. Bioeng, Vol.50, p.291-298.

جدول ـ۱ عوامل و سطوح مورد مطالعه

عامل / سطح	زمان القاء (OD)	IPTG (mM)	لاکتوز (mM)	اسيدهاي آمينه
۱	۱	۰	۰	۰
۲	۲/۵	۰/۲	۲	A
۳	٤/۵	۱	۱۰	B

A: گلوتاميك اسيد۰,۰۱۲،اسپارتيك اسيد ۰,۰۱۴،ليزين۰,۰۹،فنيل الانين ۰,۰۰۵ گرم برليتر در يك واحدOD
B: گلوتاميك اسيد۰,۰۴۷،آسپارتيك اسيد ۰,۰۵۵،ليزين۰,۰۳۴،فنيل آلانين ۰,۰۱۹ گرم برليتر در يك واحدOD

(جدول-۲) آرايه هاي متعامدL۹

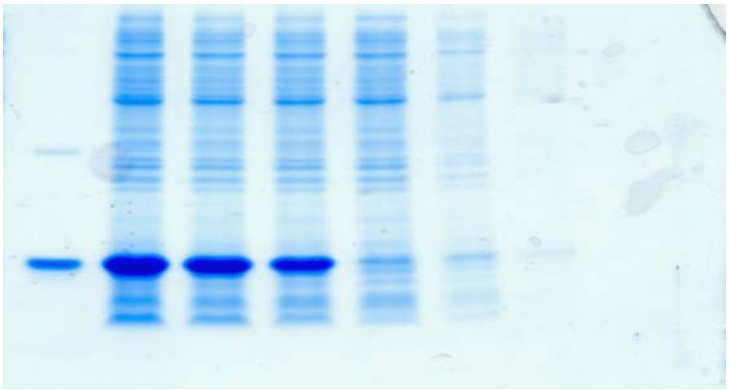
عامل / شماره	زمان القاء (OD)	IPTG (mM)	لاکتوز (mM)	اسيدهاي آمينه
۱	۱	۰	۰	۰
۲	۱	۰/۲	۲	A
۳	۱	۱	۱۰	B
٤	۲/۵	۰	۲	B
۵	۲/۵	۰/۲	۱۰	۰
٦	۲/۵	۱	۰	A
۷	٤/۵	۰	۱۰	A
۸	٤/۵	۰/۲	۰	B
۹	٤/۵	۱	۲	۰

(جدول-۳) شرايط بهينه پيش بيني شده براي كسب بالاترين بهره دهي كلي توليد اينترفرون گاماي انساني

عامل / سطح	سطح	مشخصه سطح بهينه
زمان القاء (OD)	۳	٤/۵
IPTG (mM)	۲	۰/۲
لاکتوز (mM)	۲	۲
اسيدهاي امينه	۱	A

مقدار پيش بيني شده بهره دهي كلي	۱٦۰± ۵ mg/L.h
مقدار بدست آمده از آزمايش در شرايط بهينه	۱,۷۵ mg/L
ميزان بيان	۵۵-٦۰ %
وزن خشك نهايي براي توليد بهينه	۵/۵ g/L

M 1 2 3 4 5



شكل۱: ژل SDS-PAGE حاصل از بيان پروتئين نوتركيب اينترفرون گاماي انساني در شرايط بهينه تخمير:زمان القاء (OD) ٤/۵، مقدار ۰/۲(mM) IPTG ، لاكتوز (mM)۲ ، اسيدهاي آمينه A (Mشاهد ، ۱ سه ساعت بعد از القاء ،۲ دو ساعت بعد از القاء ،۳ يك ساعت بعد از القاء ،٤ زمان القاء،۵ يك ساعت قبل القاء