بهینه سازی شرایط کشت باکتری *اشرشیا کولی* برای اصلاح تولید قطعه C-D نوترکیب باکتریورودوپسین

سیروان خوانچه‌زر، سمیره هاشمی نجف‌آبادی*+، جعفر محمدیان موسی آبادی، رسول خلیل‌زاده، سمانه اسفندیار

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۱۴ ـ ۱۴۱۱۵

چکیده: در بررسی حاضر، بخش CD از پروتئین باکتریورودوپسین (BR) در اشرشیاکولی نوترکیب بیان شد. ژن موتانت BR با در نظر گرفتن کدون مورد استفاده در اشرشیاکولی ساخته شد. ژن ساخته شده در پلاسمید بیانی pET21a+ در محل‌های برش Nde I و Hind III کلون شده و تحت کنترل پیش‌بر T7 با موفقیت بیان شد. پروتئین بیان شده با SDS PAGE تجزیه شد. اثر دما (A)، زمان القا (B) و زمان فرایند پس از القا (C) روی بازدهی میزان بیان پروتئین (میزان فراورده بر واحد جرم خشک سلول) با استفاده از تجزیه‌های جدول Yates غربالگری شد. سه عامل A، B و C مهم بودند و با روش تاگوچی بهینه شدند. شرایط بهینه عبارتند از: دما ۳۷ °C، زمان القا در ۰/۷ = OD_{600} و زمان فرایند پس از القا ۴ ساعت. همچنین، تولید پیش‌بینی شده پروتئین در شرایط بهینه، ۲۱/۵۴٪ از کل پروتئین سلولی بود. با استفاده از شرایط بهینه به دست آمده، تأثیر افزودن اسیدهای آمینه روی میزان بیان بخش CD نوترکیب باکتریورودوپسین و رشد باکتری در اشرشیاکولی با استفاده از محیط کشت M9 مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل جدول Yates نشان داد که اسیدهای آمینه آلانین، ترئونین و لیوسین دارای اثر بیشتری روی بیان پروتئین بودند و برای افزودن به محیط کشت در فرمانتور در دو سطح گوناگون انتخاب شدند. نتیجه‌ها نشان دادند که افزودن اسیدهای آمینه باعث افزایش بازدهی تولید پروتئین مورد نظر می‌شود، اما تأثیر ناچیزی روی رشد باکتری دارد.

واژه‌های کلیدی: اشرشیا کولی، باکتریورودوپسین، قطعه C-D، بهینه سازی، پروتئین نوترکیب.

KEY WORDS: *E. coli, Bacterirhodopsin, C-D fragmen, Optimization, Recombinant protein.*

مقدمه

سویه *اشرشیاکولی* یکی از پر کاربردترین میزبان‌های پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است، زیرا مشخصه‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و سامانه‌های بیانی آن به خوبی شناخته شده‌اند [۱]. همچنین، این سویه توانایی رشد با سرعت بالا و رسیدن به تراکم‌های سلولی بالا روی گوهر مایه‌های ارزان قیمت را داشته و تعداد بسیار زیاد و در حال افزایشی از حامل‌های کلونینگ و موتانت‌های گوناگون برای آن وجود دارد [۲].

سویه *اشرشیا کولی* BL21 یکی از مهم‌ترین میزبان‌های میکروبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در کشت ناپیوسته است. میزان بازدهی یا شدت تولید در فرایندهای ناپیوسته، نه تنها به انتخاب میزبان، نوع حامل و اثرهای فیزیولوژیکی جانبی

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: s.hashemi@modares.ac.ir

به وجود آمده در اثر پروتئین‌های تولید شده بستگی دارد، بلکه به شرایط رشد و راه کار القا نیز وابسته است [۳].

باکتریورودوپسین(۱)، پروتئین غشائی که در سویه *هالوباکتریوم سالیناریوم* یافت می‌شود [۷ـ۴]، دارای وزن مولکولی ۲۶ KDa با ۲۴۸ اسید آمینه است. این پروتئین در یک مجموعه هفت تایی از مارپیچ های غشائی با حلقه‌های ارتباطی کوچک، تا خورده و یک بخش رتینال به صورت کووالانسی به گروه اپسیلون آمینوی واحد Lys-216 آن متصل شده است [۸]. این پروتئین به صورت طبیعی، در یک آرایه بلورین دو بعدی منظم، به طور معمول با عنوان صفحه غشای ارغوانی، دیده می‌شود [۹]. باکتریورودوپسین به عنوان یک پمپ پروتونی با نیروی محرکه نوری در غشای خارجی ارگانیسم‌ها عمل کرده و یک منبع انرژی فوتوسنتزی را در حالتی‌که غلظت اکسیژن به پایین‌تر از سطح قابل تحمل برای تنفس افت می‌کند، فراهم می‌نماید [۱۰]. باکتریورودوپسین از انرژی نورانی برای ایجاد نیروی محرکه پروتونی به منظور آسان کردن انتقال فعال، تنظیم پروتئین‌های غشائی یا تولید ATP و NADH استفاده می‌کند [۱۱]. به تازگی، به دلیل دارا بودن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نوری دلخواه، کاربردهای بسیاری در طراحی تجهیزات الکترونی مولکولی و کامپیوترهای نوری برای باکتریورودوپسین پیشنهاد شده است [۹]. *ارن*(۲) در مقاله خود بیان کرده است که گرچه صدها ثبت اختراع در حال حاضر وجود دارد که انواع متفاوت استفاده های ممکن از این پروتئین را شرح می‌دهند، اما هنوز کاربرد تجاری واقعی وجود ندارد. ایده‌های زیادی درباره برخی از کاربردهای آن وجود دارد که ممکن است به کاربردهای زیست فناوری این پروتئین در آینده نزدیک منجر شود [۱۲].

فردریش(۳) و *همکاران* در ۱۹۹۳ میلادی باکتریورودوپسین نوترکیب را در *اشرشیا کولی* بیان دادند، اما بیان آن به صورت همگن، با مشکلاتی مانند بازدهی پایین تولید همراه بود [۸].

BR را می‌توان با متصل کردن قطعه‌های مکمل آن که با بیان نوترکیب یا در اثر فرایند پروتئولیتیک یا سنتز پپتیدها تولید شده و شامل یک یا چند بخش غشائی پروتئین هستند نیز تولید کرد [۱۳]. مارپیچ‌های C، D و G مربوط به BR، دارای واحدهای کربوکسیلی قابل یونیزه شدن (Asp-85, Asp-96, Asp-115, Asp-212) هستند که در نزدیک مرکز بخش غشائی مربوطه قرار دارند. در ساختار سرهم شده، این گروه‌های بسیار قطبی، در قسمت داخلی مجموعه مارپیچی هفت تایی، یا به عبارتی درون پاکت اتصال رتینالی یا کانال پروتونی قرار می‌گیرند [۲]. توالی بخش C-D موتانت BR به این صورت نشان داده می‌شود[۱۳].

MIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADQGTILA
LVGADGIMIGTGLVGALTKV

در این بررسی، بخش C-D پروتئین BR در باکتری *اشرشیاکولی* نوترکیب بیان شد. این بخش از ۵۴ اسید آمینه تشکیل شده است. ژن موتانت BR (واحدهای آمینو اسیدی ۱۳۰–۷۷ مارپیچ C-D) با در نظر گرفتن کدون‌های *اشرشیاکولی* ساخته شد. عامل‌های مؤثر بر بازدهی بیان پروتئین (مقدار فراورده تولید شده بر واحد وزن خشک سلولی) با استفاده از تجزیه و تحلیل جدول Yates غربال شدند. سپس، عامل‌های مهم‌تر با استفاده از روش طراحی تاگوچی بهینه شدند. فرایند تولید، تحت تأثیر عامل‌های بسیاری مانند حالت کشت، ترکیب درصد محیط کشت، زمان القا (با توجه به جرم سلولی) و مدت زمان فاز تولید قرار دارد [۱۴]. هدف نهایی بهینه سازی فرایند تخمیر، افزایش بهره‌وری کلی (مقدار فراورده بر واحد حجم در واحد زمان) است [۱۵]. بهره‌وری حجمی به چگالی نهایی سلولی (مقدار وزن خشک سلولی بر لیتر)، بازدهی ویژه (میزان فراورده تولید شده بر واحد وزن خشک سلولی) و زمان فرایند وابسته است [۱۷، ۱۶]. همچنین، یکی از ویژگی‌های فرایند تخمیر، خالی شدن محتوی آمینو اسیدی درون سلولی در طی بیان بیش از حد پروتئین‌های نوترکیب است. بنابراین، تأمین اسیدهای آمینه مورد نیاز در محیط کشت، برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، به عنوان یک راه حل مؤثر برای این مشکل پیشنهاد شده است. پس، اثر افزودن اسیدهای آمینه روی سطح بیان بخش C-D باکتریورودوپسین نوترکیب و رشد باکتری نیز بررسی شد. از آنجا که بیان پروتئین‌های هترولوگ، به سلول میزبان تنش وارد کرده و سرعت رشد آن را کاهش می‌دهد، در این پژوهش ابتدا شرایط کشت باکتری *اشرشیا کولی* نوترکیب مولد قطعه C-D باکتریورودوپسین در ارلن بهینه شد. سپس، تلاش شد تا اثر افزایش اسیدهای آمینه (با بیشترین تعداد دفعه‌های ظهور در پروتئین هدف) به محیط کشت باکتری در شرایط بهینه به‌دست آمده، بر میزان تولید پروتئین هدف و رشد سلولی سنجیده شود. در نهایت، اثر اسیدهای آمینه مهم انتخاب شده در این مرحله، در کشت ناپیوسته در فرمانتور سنجیده شد تا تنش به دست آمده از بیان پروتئین هترولوگ بر میزبان جبران شود.

(۱) Bacterirhodopsin (BR)

(۲) Oren

(۳) Friedrich

جدول ۱ـ عامل‌ها و سطح‌های انتخاب شده برای طراحی جدول Yates.

عامل	A دما (°C)	B دانسیته نوری در زمان القا	C زمان فرایندپس از القا (h)
سطح بالا (+)	۳۷	۱/۵	۴
سطح پایین (-)	۳۰	۰/۷	۲

بخش تجربی

ریزسازواره

از باکتری *اشرشیاکولی* BL21 (DE3) به عنوان میزبان برای بیان بخش C-D باکتریورودوپسین استفاده شد. انتقال ژن با استفاده از پلاسمید بیانی قابل القای $pET21a^+$ انجام شد. ژن ساخته شده، در محل های برش Nde I و Hind III در پلاسمید بیانی pET21a+ وارد شده و تحت کنترل پیش‌بر[1] T7 با موفقیت بیان شد. باکتری *اشرشیا کولی* نوترکیب استفاده شده در این پژوهش، در دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مرکز فناوری زیستی تهیه شده است.

تهیه محیط کشت و القا

از محیط کشت‌های LB agar و LB broth، به ترتیب برای کشت سویه بر روی بشقابک و در لوله آزمایش استفاده شد. ابتدا، باکتری نوترکیب *اشرشیاکولی* از فریزر °C ۷۰- خارج شده و در دمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت روی بشقابک‌های محیط LB دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/L) کشت داده شد. سپس، یک کلونی از بشقابک به یک لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت LB broth دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/L) منتقل شده و در دمای °C ۳۷ و ۲۰۰ rpm درون گرمخانه دوار کشت داده شد. از این کشت برای تلقیح ۱۰۰ mL محیط کشت LB broth دارای آمپی‌سیلین در فلاسک استفاده شد. زمانی که دانسیته نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به مقدار دلخواه رسید (بر اساس جدول طراحی آزمایش)، القاگر ایزوپروپیل بتا-D- تیوگالاکتوزید (IPTG) با غلظت ۱ mM به محیط کشت افزوده شد.

روش‌های تجزیه

دانسیته نوری نمونه در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد. میزان بیان پروتئین نوترکیب باکتریورودوپسین، با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE روی ژل ۱۵٪ سنجیده شد. ژل‌ها با محلول کوماسی آبی رنگ R250 (۰/۱٪ وزنی حجمی) رنگ آمیزی شده و میزان بیان پروتئین با استفاده از دستگاه ژل دانسیتومتر (Pharmacia LKB Ultrascan XL) سنجیده شد. شاخص‌های وزن مولکولی از شرکت Pharmacia تهیه شدند.

روش‌های آماری

برای غربال‌گری عامل‌های مؤثر و برهمکنش‌های مهم بین آنها از جدول Yates استفاده شد. عامل‌های انتخاب شده، عبارت بودند از: دما (A)، زمان القا (B) و زمان فرایند پس از القا (C). سطوح مربوط به زمان القا به گونه‌ای انتخاب شد تا القای بیان پروتئین هدف در مرحله رشد لگاریتمی ریزسازواره انجام شود. سطوح مربوط به زمان فرایند پس از القا بر مبنای پلاسمید به کار برده شده در این پژوهش انتخاب شد، زیرا بیان پروتئین در سامانه pET فقط تا چند ساعت پس از القا ادامه خواهد داشت. در تعیین سطوح دما سعی شد که دما روی بیشترین مقدار ممکن برای *اشرشیا کلی* قرار داشته باشد و زیاد کاهش نیابد تا مانع از رشد ریزسازواره نشود. جدول ۱ سطوح مربوط به این عامل‌ها را برای طراحی جدول Yates نشان می‌دهد.

پس از مشخص شدن عامل‌ها و برهم کنش‌های مهم با استفاده از بررسی‌های مربوط به جدول Yates، بهینه‌سازی شرایط فرایند، در سه سطح، با روش تاگوچی (آرایه L_9) انجام شد. سطوح مربوط به عامل‌های انتخاب شده برای طراحی تاگوچی در جدول ۲ نشان داده شده است. از نرم‌افزار Mini Tab 15 برای تجزیه و تحلیل نتیجه‌ها استفاده شد. لازم به یادآوری است که همه آزمایش‌ها، با دو بار تکرار انجام شده و نتیجه‌ها به صورت میانگین دو پاسخ به دست آمده ارایه شده اند.

غربال‌گری اسیدهای آمینه

در مرحله بعد، برای تعیین اسیدهای آمینه مؤثرتر در تولید پروتئین مورد نظر، لوسین (L)، آسپارتیک اسید (D)، آلانین (A) و ترئونین (T) که بیشتر از سایر اسیدهای آمینه در پروتئین دلخواه تکرار می شوند، برای افزودن به محیط کشت انتخاب شدند. غربال‌گری این اسیدهای آمینه در دو سطح (جدول ۳) و

(۱) Promoter

جدول ۲ـ عامل‌ها و سطح‌های انتخاب شده برای طراحی تاگوچی.

عامل	سطح پایین (۱)	سطح میانه (۲)	سطح بالا (۳)
A دما (°C)	۳۰	۳۴	۳۷
B دانسیته نوری در زمان القا	۰/۷	۱/۰	۱/۵
C زمان فرایند پس از القا (h)	۲	۳	۴

جدول ۳ـ سطح‌های مربوط به غلظت اسیدهای آمینه انتخاب شده برای غربال‌گری.

اسیدهای آمینه	سطح پایین	سطح بالا
آلانین (g/L) (A)	۰/۰۰۰	۰/۰۵۵
لوسین (g/L) (L)	۰/۰۰۰	۰/۱۵۰
ترئونین (g/L) (T)	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰
آسپارتیک اسید (g/L) (D)	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰

جدول ۴ـ اسیدهای آمینه مهم انتخاب شده در مرحله غربال‌گری و سطح‌های آنها برای کشت در فرمانتور.

سطح	ترئونین	لوسین	آلانین
۱ (g/L)	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۲ (g/L)	۰/۰۶	۰/۱۵	۰/۰۶
۳ (g/L)	۰/۱۲	۰/۳۰	۰/۱۲

با استفاده از طراحی جدول Yates، در فلاسک انجام شد. سطوح مربوط به غلظت اسیدهای آمینه آلانین، ترئونین، آسپارتیک اسید و لوسین که دارای بیشترین تعداد در پروتئین هدف هستند، بر مبنای روش زیر تعیین شد. ابتدا وزن خشک نهایی سلولی بر اساس غلظت سلولی (برحسب تراکم نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در انتهای فرایند تعیین شد. سپس، مقدار کل پروتئین سلولی با تعیین نسبت کل پروتئین سلولی بر وزن خشک سلولی تعیین شد (این نسبت با روش بردفورد تعیین شد و برابر با ۰/۴ است. نتیجه‌های آن در این مقاله نشان داده نشده است). سپس، غلظت هر اسید آمینه بر مبنای دست یابی به درصد بیان معادل ۳۰٪ و نسبت وزنی هر اسید آمینه به وزن مولکولی پروتئین هدف تعیین شد.

کشت ناپیوسته

کشت ناپیوسته در فرمانتور همزن دار ۲ لیتری (INFORS, Switzerland) با حجم کاری ۱ لیتر انجام شد. متغیرهای دما، pH و میزان هوادهی به ترتیب در °C ۳۷، ۷ و ۱ vvm تنظیم شدند. پس از آماده سازی و سترون کردن محیط کشت M9، مایه تلقیح (v/v ۱۰٪) به محیط کشت افزوده شد. پس از رسیدن به دانسیته نوری دلخواه در طول موج nm ۶۰۰ (بر اساس منحنی رشد که نتیجه‌های آن در این مقاله ارایه نشده است)، بیان ژن با استفاده از IPTG القا شده و ۴ ساعت پس از القا نمونه گیری انجام شد. مهم ترین اسیدهای آمینه ای که در مرحله قبل انتخاب شدند، در دو سطح (جدول ۴) به فرمانتور افزوده شدند.

نتیجه ها و بحث

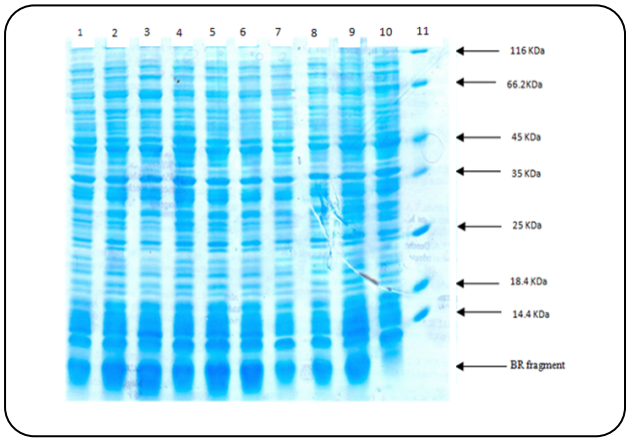
بهینه سازی شرایط کشت

نتیجه‌های تجزیه و تحلیل مربوط به جدول Yates در جدول ۵ ارایه شده است. با توجه به مقدارهای به دست آمده P-value از تجزیه جدول Yates (P-value<۰/۱)، عامل‌های مهم عبارت بودند از: A، B، C و برهمکنش‌های B*C و A*B*C. بنابراین،

جدول ۵ ـ طراحی جدول Yates و نتیجه‌های به دست آمده از غربال گری عامل‌ها و برهم کنش‌های مهم.

ترکیب آزمایش‌ها[×]	A دما (°C)	B دانسیته نوری در زمان القا	C زمان فرایند پس از القا (h)	$Y_{Average}$(درصد بیان)	F-ratio	P-value
(1)	۳۰	۰/۷	۲	۷/۳۰۵	-	-
a	۳۷	۰/۷	۲	۱۱/۱۴۰	۷۰/۱۵	۰/۰۰۰
b	۳۰	۱/۵	۲	۴/۷۱۰	۴/۸۳	۰/۰۵۹
ab	۳۷	۱/۵	۲	۱۶/۰۵۰	۰/۷۵	۰/۴۱۳
c	۳۰	۰/۷	۴	۸/۷۵۵	۴/۸۶	۰/۰۵۹
ac	۳۷	۰/۷	۴	۱۹/۳۶۵	۰/۱۸	۰/۶۷۹
bc	۳۰	۱/۵	۴	۵/۲۸۰	۷/۹۹	۰/۰۲۲
abc	۳۷	۱/۵	۴	۱۲/۴۳۰	۹/۵۷	۰/۰۱۵

[×] *عدد ۱ نشان دهنده سطح پایین هر عامل و حروف کوچک نشان دهنده سطح بالای آن است.*



شکل ۱ـ تجزیه SDS-PAGE مربوط به نتیجه‌های طراحی تاگوچی. ستون های ۹-۱: نتیجه آزمایش‌های شماره ۹-۱ (مطابق جدول ۶)، ستون ۱۰ نمونه کنترل (القا نشده) و ستون ۱۱: شاخص وزن مولکولی.

بهینه‌سازی شرایط کشت با استفاده از روش تاگوچی و با در نظر گرفتن عامل‌های A، B و C انجام شد. نتیجه‌های مربوط به تجزیه و تحلیل روش تاگوچی در جدول ۶ آورده شده است. شکل ۱، ژل SDS-PAGE مربوط به طراحی تاگوچی را مطابق با جدول ۶ نشان می‌دهد. این شکل، میزان بیان بخش C-D باکترورودوپسین را در هر آزمایش ارایه می‌کند.

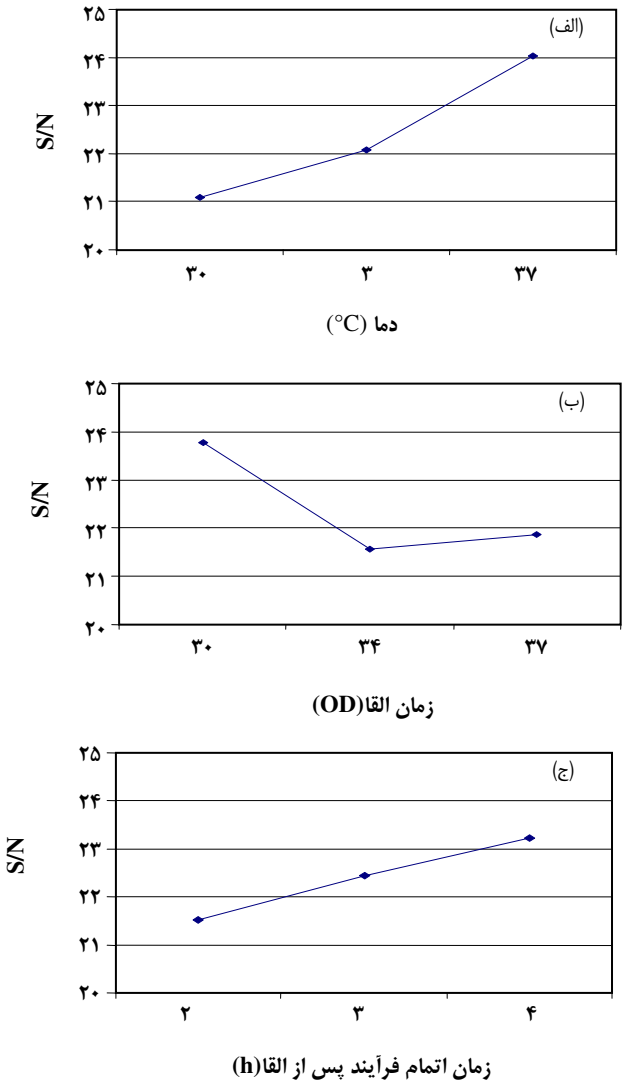
شکل ۲ منحنی‌های نسبت S/N را برای متغیرهای اصلی در طراحی تاگوچی، وقتی مقدار بیشتر مطلوب است، نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که شرایط بهینه عبارتند از: دمای ۳۷ °C، دانسیته نوری القا در طول موج ۶۰۰ nm برابر ۰/۷ و زمان فرایند پس از القا ۴ h. نتیجه پیش‌بینی شده در شرایط بهینه (به دست آمده با استفاده از نرم افزار Mini Tab) برای درصد بیان فراورده‌ی مورد نظر، ۲۱/۴۲٪ بود.

به دلیل کاهش pH محیط کشت و نبود امکان کنترل آن در فلاسک، با افزایش زمان القا، بازدهی تولید کاهش می‌یابد. کاهش pH محیط کشت، توانایی *اشرشیاکولی* را در تولید پروتئین نوترکیب کاهش می‌دهد. اما، این حالت به طور معمول در فازهای پس از القا دیده می‌شود، به ویژه وقتی که القا پس از رسیدن به یک غلظت سلولی مشخص انجام می‌شود که شاید به دلیل حضور نداشتن متابولیت‌های لازم است. برای مثال، مشخص شده است که تمام شدن بعضی از اسیدهای آمینه در محیط کشت، به طور مؤثری روی بیان پروتئین های نوترکیب اثر می‌گذارد [۱۴].

توسعه سایر ابزارهای تولید، از قبیل پیش‌برها، در اساس بر پایه این نظریه است که توده سلولی در اولین مرحله تولید شده و پس از آن سلول‌ها باید درگیر تولید فراورده شوند. بنابراین، پیش‌برهای قوی مانند tac و T7 می توانند فقط برای یک دوره کوتاه زمانی پس از القا استفاده شوند، زیرا به طور معمول شدت تشکیل فراورده پس از چند ساعت کاهش پیدا می کند. پس از این دوره، تولید به شدت کاهش یافته و به صفر می‌رسد و در بدترین حالت، پروتئین فراورده تخریب می‌شود. از نقطه نظر فرایندی، این رفتار سریع و دینامیکی، هدایت فرایند را بسیار مشکل می‌کند [۱۸]. بنابراین، زمان پایان فرایند پس از القا بهینه شد و مشخص شد که تشکیل فراورده در ۴ ساعت پس از القا بهینه شده و با افزایش زمان تا ۴ ساعت پس از القا تولید آن افزایش می‌یابد.

جدول ۶ ـ طراحی تاگوچی (آرایه L9) در سه سطح و نتیجه‌های به دست آمده از آن.

شماره آزمایش	A دما (°C)	B دانسیته نوری در زمان القا	C زمان فرایند پس از القا (h)	$Y_{Average}$ (درصد بیان)	S/N_L
۱	۳۰	۰/۷	۲	۱۴/۶۰	۲۲/۹۵
۲	۳۰	۱/۰	۳	۹/۵۶	۱۹/۴۲
۳	۳۰	۱/۵	۴	۱۱/۱۱	۲۰/۹۰
۴	۳۴	۰/۷	۳	۱۴/۲۰	۲۳/۰۲
۵	۳۴	۱/۰	۴	۱۴/۹۰	۲۳/۴۳
۶	۳۴	۱/۵	۲	۹/۸۰	۱۹/۷۸
۷	۳۷	۰/۷	۴	۱۸/۵۲	۲۵/۳۵
۸	۳۷	۱/۰	۲	۱۲/۷۰	۲۱/۸۴
۹	۳۷	۱/۵	۳	۱۷/۶۲	۲۴/۹۲



شکل ۲ـ منحنی S/N بـرای متغیرهـای اصـلی در طراحـی تـاگوچی: (الف) دما، (ب) زمان القا و (ج) زمان پایان فرایند.

غربال‌گری اسیدهای آمینه

در مرحله غربال‌گری اسیدهای آمینه مؤثر، پس از آماده سازی و سترون کردن محیط کشت M9، مایه تلقیح با نسبت v/v ۱۰٪ به فلاسک‌ها افزوده شد. شرایط تخمیر (مطابق با نتیجه‌های به دست آمده از روش تاگوچی) عبارت بودند از: دمای ۳۷ °C، دانسیته نوری القا برابر ۰/۷ در OD_{600} و زمان خاتمه فرایند پس از القا ۴ h.

طراحی جدول Yates و نتیجه‌های به دست آمده، با استفاده از اسکن ژل SDS-PAGE به وسیله دانسیتومتر، برای غربال‌گری اسیدهای آمینه در فلاسک، در جدول ۷ ارایه شده است. تجزیه و تحلیل واریانس و به دست آوردن P-value با استفاده از نرم افزار Mini Tab 15 انجام شد. بر اساس نتیجه‌های به دست آمده و با در نظر گرفتن P-value<۰/۱ اسیدهای آمینه آلانین، لوسین و ترئونین بیشترین تأثیر را بر روی میزان بیان بخش C-D باکتریورودوپسین داشتند.

شکل ۳، ژل SDS-PAGE مربوط به بیان پروتئین را در فرمانتور و جدول ۸ نتیجه‌های تعیین درصد بیان پروتئین را با استفاده از دانسیتومتر نشان می‌دهد. نتیجه‌ها نشان می‌دهند که افزودن اسیدهای آمینه باعث افزایش بیان پروتئین دلخواه شده، اما تأثیر چندانی روی رشد باکتری (مطابق با دانسیته سلولی به دست آمده) ندارد. این پدیده ممکن است به علت انتخاب اسیدهای آمینه بر اساس فراورده بوده یا تأثیر منفی تولید فراورده روی رشد باکتری باشد.

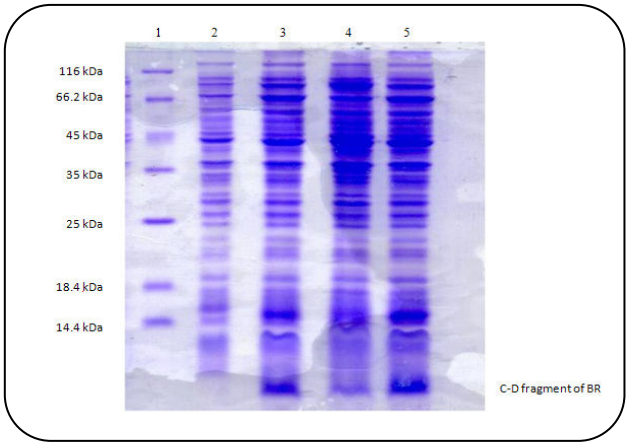
نتیجه‌گیری

بخش C-D باکتریورودوپسین در باکتری نوترکیب *اشرشیاکولی* بیان شد. ژن موتانت باکتریورودوپسین (واحدهای ۷۷-۱۳۰،

جدول ۷ـ طراحی جدول Yates و نتیجه‌های به دست آمده از غربال‌گری اسیدهای آمینه در فلاسک.

شماره آزمایش	ترکیب آزمایش[×]	A آلانین (g/L)	L لوسین (g/L)	T ترئونین (g/L)	D آسپارتیک اسید (g/L)	نتیجه‌ها (درصد بیان)	P-value
۱	(1)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۸/۲	-
۲	a	۰/۰۵۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱۲/۴	۰/۰۰۰
۳	l	۰/۰۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱۳/۱	۰/۰۰۰
۴	al	۰/۰۵۵	۰/۱۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱۴/۹	۰/۱۸۹
۵	t	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰	۹/۰	۰/۰۰۱
۶	at	۰/۰۵۵	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰	۱۲/۵	۰/۰۸۱
۷	lt	۰/۰۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰	۱۲/۹	۰/۰۱۰
۸	alt	۰/۰۵۵	۰/۱۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰	۱۴/۱	۰/۱۷۱
۹	d	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۱۲/۴	۰/۷۲۸
۱۰	ad	۰/۰۵۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۱۶/۲	۰/۰۱۲
۱۱	ld	۰/۰۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۱۲/۸	۰/۲۰۹
۱۲	ald	۰/۰۵۵	۰/۱۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۱۶/۱	۰/۹۴۰
۱۳	td	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۲/۵	۰/۳۱۸
۱۴	atd	۰/۰۵۵	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۲/۴	۰/۰۵۱
۱۵	ltd	۰/۰۰۰	۰/۱۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۴/۶	۰/۱۴۷
۱۶	altd	۰/۰۵۵	۰/۱۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۳/۶	۰/۸۹۲

[×] *عدد ۱ نشان دهنده سطح پایین هر عامل و حروف کوچک نشان دهنده سطح بالای آن است.*



شکل ۳ـ تجزیه SDS-PAGE مربوط به بیان بخش C-D در فرمانتور. ستون۱: شاخص وزن مولکولی، ستون ۲: نمونه شاهد (بدون القاء)، ستون ۳: آزمایش سطح ۳ (مربوط به جدول ۴)، ستون ۴: آزمایش سطح ۱ (مربوط به جدول ۴) و ستون ۵: آزمایش سطح ۲ (مربوط به جدول ۴).

مارپیچ‌های C-D) با در نظر گرفتن کدون‌های *اشرشیاکولی* تهیه شد. عامل‌های مؤثر در بازدهی بیان پروتئین (مقدار پروتئین تولید شده بر واحد جرم خشک سلولی) با تجزیه و تحلیل جدول Yates غربال شد. سپس، عامل‌های مهم با استفاده از روش تاگوچی بهینه شدند. شرایط بهینه عبارت بودند از: دمای ۳۷ °C، دانسیته سلولی القا (OD_{600}) برابر ۰/۷ و زمان خاتمه فرایند پس از القا ۴ ساعت. نتیجه پیش‌بینی شده برای درصد دلخواه پروتئین تولید شده در شرایط بهینه (به دست آمده توسط نرم افزار Mini Tab) ۲۱/۴۲٪ است. دما بیشترین تأثیر را روی بازدهی تولید پروتئین داشته، می‌تواند سرعت رشد ویژه *اشرشیاکلی* را زیاد کند و سرانجام بازدهی حجمی پروتئین نوترکیب (مقدار پروتئین تولید شده بر واحد حجم و زمان) را افزایش دهد.

پس از دست یافتن به شرایط بهینه عملیاتی برای رسیدن به بهترین بازده تولید بخش C-D باکتریوپسین، تأثیر ۴ اسید آمینه مهم

جدول ۸ ـ دانسیته نوری کشت و درصد بیان پروتئین با استفاده از ژل دانسیتومتر، مربوط به بیان پروتئین در فرمانتور.

شرایط آزمایش[×]	درصد بیان پروتئین	دانسیته نوری کشت
بدون القاء	۰/۰	۹/۴
سطح ۱	۷/۵	۵/۷
سطح ۲	۱۴/۵	۶/۲
سطح ۳	۱۷/۵	۶/۴

[×] *سطح‌های بیان شده، مربوط به جدول شماره ۴ است.*

مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که اسیدهای آمینه آلانین، ترئونین و لوسین دارای بیشترین اثر روی سطح بیان قطعه C-D باکتریوپسین بودند. افزودن اسیدهای آمینه میزان بازدهی تولید پروتئین مورد نظر را افزایش داد، اما تأثیر چندانی روی رشد باکتری نداشت.

تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۳/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۲/۲/۱۶

مراجع

[1] Jong H.C., Ki C.K., Sang Y.L., Production of Recombinant Proteins by High Cell Density Culture of *Escherichia coli, Chem Eng Sci.,* **61**, p.876 (2006).

[2] Baneyx F., Recombinant Protein Expression in *E.coli, Curr. Opin. Biotechnol.,* **10**, p.411 (1999).

[3] Morten L.C., Niels T.E., Growth and Proton Exchange in Recombinant *Escherichia coli* BL21, *Enzyme Microb. Technol.,* **31**, p. 566 (2002).

[4] Jin Y., Girshevitz O., Friedman N., Ron I., Cahen D., Sheves M., Covalent Attachment of Bacteriorhodopsin Monolyer to Bromo-terminated Solid Supports: Preparation, Characterization, and Protein Stability, *Chem Asian J.,* **3**, p.1146 (2008).

[5] Luneburg J., Widmann M., Dathe M., Marti T., Secondary Structure of Bacteriorhodopsin Fragments, *J. Biol. Chem.,* **273**, p.28822 (1998).

[6] Nekrasova O.V., Wulfson A.N., Tikhonov R.V., Yakimov S.A., Simonova T.N., Tagvey A.I., Dolgikh D.A., Ostrovsky M.A., Kirpichnikov M.P., A New Hybrid Protein for Production of Recombinant Bacteriorhodopsin in *Escherichia Coli, J. Biotechnol.,* **147**, p.145 (2010).

[7] Xu J., Bhattacharya P., Varo G., Monolithically Integrated Bacterio- rhodopsin/semi-conductor Opto-electronic Integrated Circuit for a Bio-photoreceiver, *Biosens Bioelectron.,* **19**, p.885 (2004).

[8] Pompejus M., Friedrich K., Teufel M., Fritz H.J., High-Yield Production of Bacteriorhodopsin via Expression of a Synthetic Gene in *Escherichia coli, Eur. J. Biochem.,* **211**, p. 27 (1993).

[9] Lee S.Y., Chang H.N., Um Y.S., Hong S.H., Bacteriorhodopsin Production by Cell Recycle Culture of Halobacterium Halobium, *Biotechnol Lett.,* **20**, p.763 (1998).

[10] Xu J., Stickrath A.B., Bhattacharya P., Nees J., Varo G., Hillebrecht J.R., Ren L., Birge R.R., Direct Measurement of the Photoelectric Response Time of Bacteriorhodopsin via Electro-Optic Sampling, *Biophys. J.,* **85**, p.1128 (2003).

[11] Walter J., Greenfield D., Liphardt J., Potential of Light-Harvesting Proton Pumps for Bioenergy Application, *Curr. Opin. Biotechnol.,* **21**, p.265 (2010).

[12] Oren A., Industrial and Environmental Applications of Halophilic Microorganisms, *Environ. Technol.,* **31**, p.825 (2010).

[13] Marti T., Refolding of Bacteriorhodopsin from Expressed Polypeptide Fragments, *J. Biol. Chem.,* **273**, p.9312 (1998).

[14] Santosh O., Ramchuran O.H., Eva, N.K., Effect of Postinduction Nutrient Feed Composition and Use of Lactose as Inducer During Production of Thermostable Xylanase in *E.scherichia coli* Glucose-limited Fed-batch Cultivations, *J. Biosci. Bioeng.,* **99**, p.477 (2005).

[15] Yee L., Blanch H.W., Defined Media Optimization for Growth of Recombinant *Escherichia coli, Biotechnol Bioeng.,* **41**, p.221 (1993).

[16] Khalilzadeh R., Shojaosadati S.A., Bahrami A., Maghsoudi N., Fed-batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Producing Human Interferon-γ under Controlled Specific Growth Rate, *Iran J Biotechnol.,* **2**, p.113 (2004).

[17] Shojaosadati S.A., Varedi Kolaei S.M., Babaeipour V., Farnoud A.M., Recent Advances in High Cell Density Cultivation for Production of Recombinant Protein, *Iran. J. Biotechnol.,* **6**, p.63 (2008).

[18] Sandén A.M., Prytz I., Tubulekas I., Förberg C., Le H., Hektor A., Neubauer P., Pragai Z., Harwood C., Ward A., Picon A., De Mattos J.T., Postma P., Farewell A., Nyström T., Reeh S., Pedersen S., Larsson G., Limiting Factors in *Escherichia coli* Fed-Batch Production of Recombinant Proteins, *Biotech Bioeng.,* **81**, p. 158 (2003).