ORIGINAL ARTICLE

A Quantitative Comparison of Recombinant Hc Domain of Clostridium Botulinum Neurotoxin A in Escherichia Coli in Batch and Fed-Batch Cultivations

Kheirollah Yari[1],
Seyed Safa-Ali Fatemi[2],
Mahmood Tavallaei[3],
Mohamad Taher Moradi[4]

[1] PhD by Research Student, Student Research Committee, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biotechnology, Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Genetics, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received December 11, 2012; Accepted August 3, 2013)

Abstract

Background and purpose: The 50 KDa protein (50 µg) in carboxylic domain of the neurotoxin heavy chain (BoNT/A-Hc) recognizes surface receptors on target neurons and this fragment contains the principle protective antigenic determinants. Recently, this fragment has been used as a recombinant vaccine candidate for botulism. The study aimed to compare the evaluation of BoNT/A-Hc production in fed-batch (high cell density cultivation) and batch cultivation of recombinant Escherichia coli *(E. coli.)*.

Materials and methods: In this research, growth of recombinant *E. coli* in batch culture was studied. In order to maximize protein expression, induction time and Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducer concentration were optimized by the Taguchi statistical method. Then, fed-batch culture was applied to achieve high cell density cultivation. Finally, the recombinant protein expression level was determined.

Results: In optimized conditions, 62 and 486 mg/l of soluble recombinant BoNT/A-Hc were produced in batch and fed-batch cultivation.

Conclusion: According to the results, high cell density in fed-batch cultivation is a very effective for improve of recombinant proteins productivity.

***Keywords*:** Fed-batch, Escherichia coli, clostridium botulinum, recombinant protein

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(104): 2-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۴ شهریور سال ۱۳۹۲ (۱۰-۲)

مقایسه کمی تولید پروتئین نوترکیب انتهای کربوکسیل نوروتوکسین بوتولینوم A در کشت‌های ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده باکتری اشرشیا کلی

خیراله یاری[۱]
سید صفاعلی فاطمی[۲]
محمود تولائی[۳]
محمدطاهر مرادی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین ۵۰ کیلو دالتونی واقع در انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A (BoNT/A-Hc) امروزه برای تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم به کار می‌رود. هدف از این پژوهش بررسی تولید این پروتئین نوترکیب در باکتری اشرشیا کلی در کشت‌های با تراکم سلولی بالا (ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده) و مقایسه تولید آن با کشت‌های ناپیوسته بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، رشد باکتری اشرشیا کلی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط M9 اصلاح‌شده با فرایند کشت ناپیوسته بررسی گردید. به منظور افزایش بیان پروتئین نوترکیب، میزان غلظت القاکننده Isopropyl β-D-thiogalactoside و زمان القا در Fermentor با حجم کاری ۲ لیتر، به کمک روش آماری Taguchi بهینه گردید. سپس کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با روش خوراک‌دهی‌نمایی با حجم ثابت تا رسیدن به تراکم سلولی بالا انجام گرفت. در پایان میزان بیان پروتئین نوترکیب هدف به کمک روش Bradford و دانسیتومتری ژل SDS-PAGE محاسبه شد.

یافته‌ها: در شرایط بهینه‌شده کشت ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، به ترتیب مقدار ۶۲ و ۴۸۶ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر از محیط کشت حاصل گردید.

استنتاج: بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رسیدن به تراکم سلولی بالا در کشت‌های ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در افزایش بازدهی تولید پروتئین‌های نوترکیب بسیار مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: کشت ناپیوسته خوراک‌دهی شده، اشرشیا کلی، کلستریدیوم بوتولینوم، پروتئین نوترکیب

مقدمه

باکتری کلستریدیوم بوتولینوم (Clostridium botulinum) بر اساس ویژگی‌های آنتی‌ژنیک به ۷ نوع مختلف تقسیم‌بندی شده‌اند و با حروف A تا G معرفی گردیده‌اند. انواع A، B و E به طور عمده در انسان و C و D به طور معمول در حیوانات بیماری‌زا می‌باشند (۱). باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، یک نوروتوکسین قوی از گروه متالوپروتئازها تولید می‌کند که قادر است با راه یافتن توکسین از طریق سطوح مخاطی نظیر روده، بافت ریه و یا محل زخم به گردش خون وارد شود و با ممانعت از آزاد شدن استیل کولین در پایانه‌های عصبی سبب ایجاد فلج عضلانی پیش‌رونده گردد که در موارد حاد، اغلب با مرگ همراه است (۲). توکسین بوتولینوم از نظر عملکردی به سه بخش تقسیم می‌شود: زنجیره

مولف مسئول: خیراله یاری – کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی. E-mail: khirollah.yari@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. استادیار، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه زیست فناوری، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۵/۱۲

سنگین با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلودالتون شامل بخش اتصال‌دهنده (Binding domain) در ناحیه C ترمینال و بخش انتقال‌دهنده در ناحیه N ترمینال آن، زنجیره سبک با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون که در بردارنده بخش آنزیمی توکسین است (۳). انسان در اثر مصرف آب و مواد غذایی آلوده به سم، به بیماری بوتولیسم مبتلا می‌گردد. این بیماری به طور طبیعی به شکل‌های مسمومیت غذایی، بوتولیسم زخم و بوتولیسم روده‌ای تظاهر می‌نماید. احتمال انتقال فرم استنشاقی بیماری، در پی کاربردهای بیوتروریستی نیز وجود دارد (۴).

با توجه به گزارش‌های علمی منتشرشده، در حال حاضر عمده تلاش‌های پژوهشگران در زمینه بوتولیسم، تهیه واکسن‌های نوترکیب چند ظرفیتی (Polyvalent) علیه سم می‌باشد (۷-۵). مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین ۵۰ کیلودالتونی واقع در انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A (BoNT/A-Hc) که وظیفه اتصال توکسین به غشای سلول‌های عصبی را بر عهده دارد، از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار می‌باشد. بیشتر تحقیقات در زمینه تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم روی این بخش از توکسین متمرکز شده است، تا بتوان با تولید آنتی‌بادی بر علیه آن مانع از اتصال اولیه توکسین به گیرنده‌های سطح سلولی شد و بدین طریق از ورود سم به داخل سلول جلوگیری گردد. به همین دلیل بیان ژن این قطعه از توکسین در سیستم‌های مختلف پروکاریوتی و یوکاریوتی مورد توجه می‌باشد (۹، ۸). از آن جا که کدون‌های کدکننده اسیدهای آمینه کلستریدیوم غنی از بازهای آدنین و تیمین می‌باشند، بیان ژن‌های کلستریدیوم، در *E. coli* (اشرشیا کلی) پایین می‌باشد (۴). در نتیجه محققین روش‌های مختلفی برای حل این مشکل اتخاذ کرده‌اند. (۱۰، ۸-۵). یکی از این روش‌ها که در حقیقت هدف این پژوهش بود، استفاده از روش کشت با تراکم سلولی بالا (High cell density cultivation) است (۱۱). مفهوم این فرایند تولید بیشترین محصول در واحد حجم در کمترین زمان ممکن و افزایش بهره‌دهی محصول است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از سویه باکتریایی *E. Coli BL21 (DE3)* به عنوان میزبان و پلاسمید نوترکیب PET28a به عنوان حامل ژن کدکننده استفاده شد که از شرکت نواژن (Novagen) خریداری شده بودند (۵). در ساختار این پلاسمید ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامیسین به عنوان نشانگر انتخابی وجود دارد. همچنین پلاسمید، حاوی پروموتر T7، اپراتور lac و ژن تنظیمی lacI بود که القای آن توسط IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) انجام پذیرفت. از غلظت‌های مختلف IPTG (شرکت Fermentas) به عنوان القاکننده و غلظت نهایی ۳۰ میکروگرم در لیتر کانامایسین (شرکت Fermentas) به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد.

فرمانتور مورد استفاده در این تحقیق، فرمانتور نیوبرونسویک (New brunswick) مدل بایوفلو ۳۰۰۰ (Bioflo 3000) بود. این فرمانتور توانایی انجام عملیات کشت‌های ناپیوسته (Batch)، ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده (Fed-batch)، پیوسته (Continues) و همچنین کشت بافت را دارا می‌باشد و مجهز به سیستم‌های کنترل‌کننده برای دما، pH، اکسیژن محلول، کنترل کف، پمپ‌های خوراک‌دهی و دور همزن است.

از محیط کشت M9 اصلاح‌شده (جدول شماره ۱) (۵) با ترکیب شیمیایی مشخص برای کشت ناپیوسته و ناپیوسته غیر مداوم خوراک‌دهی‌شده، استفاده شد.

برای تهیه ۲۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت، همه ترکیبات محیط کشت به غیر از سولفات منیزیم و گلوکز در ۱۶۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و درون ظرف فرمانتور در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. همچنین گلوکز در ۱۰۰ میلی‌لیتر و سولفات منیزیم در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به طور جداگانه سترون گردید و پس از خنک شدن به فرمانتور اضافه شد. با اضافه کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر مایه تلقیح حجم نهایی به ۲ لیتر رسید. همچنین محلول عناصر کم مقدار که پیش از آن سترون شده بود در شرایط سترون به ظرف اضافه شد. pH محیط کشت با آمونیاک و اسید کلریدریک سترون در حد ۷/۱ تنظیم

گردید. در مرحله خوراک‌دهی (Feeding) از محلول گلوکز ۵۰۰ گرم در لیتر و سولفات منیزیم ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد (جدول شماره ۱). همچنین برای رشد سویه مورد نظر بر روی پلیت از محیط LB (Lysogeny broth) و LB آگار استفاده گردید (جدول شماره ۲). قابل ذکر است که درجه خلوص کلیه مواد محیط کشت بالا بود و این محیط‌ها از کمپانی مرک (Merck, Germany) خریداری شده بودند.

جدول شماره ۱: محیط کشت بهینه‌شده M9 اصلاح‌شده برای رشد باکتری اشرشیا کلی نوترکیب در مقیاس فلاسک و فرمانتور و محلول خوراک استفاده‌شده در کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده

ماده شیمیایی	کشت فلاسک و ناپیوسته (گرم در لیتر)	محلول خوراک (گرم در لیتر)
گلوکز	۱۵/۰	۵۰۰
MgSO4.7 H2O	۴/۰	۳۰
(NH4)2SO4	۳/۵	
K2HPO4	۳۰/۰	
KH2PO4	۱۵/۰	
اسید سیتریک	۲/۰	
محلول عناصر کمیاب (گرم در لیتر در ۱ مول اسید HCl)*	۱/۵	

* شامل: ۲/۸ گرم در لیتر FeSo4.7H2O، ۲ گرم در لیتر MnCl2.4H2O، ۲/۸ گرم در لیتر CoSO4.7H2O، ۱/۵ گرم در لیتر CaCl2.2H2O، ۰/۲ گرم در لیتر CuCl2.2H2O، ۰/۳ گرم در لیتر ZnSO4.7H2O

جدول شماره ۲: ترکیب محیط کشت LB مایع و جامد برای رشد باکتری اشرشیا کلی

محیط LB ماده (گرم در لیتر)	مایع	جامد
تریپتون	۱۰	۱۰
عصاره مخمر	۵	۵
نمک طعام	۱۰	۱۰
آگار	_	۱۵

میزان گلوکز موجود در محیط کشت توسط کیت و طبق دستورالعمل ارسال‌شده توسط شرکت شیم آنزیم (Chem Enzyme) اندازه‌گیری شد. میزان گلوکز در محیط تخمیر، به طور مرتب در فواصل زمانی یک ساعت با استفاده از کیت اندازه‌گیری شد. برای این کار یک میلی‌لیتر از محیط کشت تخمیرشده سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و محلول رویی برای سنجش گلوکز استفاده شد. جذب نمونه‌ها در ۵۰۰ نانومتر محاسبه گردید.

بعد از بررسی نمودار رشد باکتری برای تعیین شرایط بهینه و افزایش بازدهی تولید محصول از روش آماری Taguchi استفاده شد (۵). در این روش از آرایه متعامد L4 برای بررسی فاکتورهای OD (Optical density) القا در دو سطح (۴/۵ و ۱۰) و غلظت IPTG در دو سطح (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) با ۴ ترکیب آزمایشی مستقل استفاده شد (جدول شماره ۳). در آزمایش‌ها از همان محیط کشت M9 بهینه‌شده استفاده شد و شرایط به غیر از فاکتورهای مورد نظر، ثابت و یکسان نگه داشته شد. بعد از انجام آزمایشات و تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار Qulitek نسخه ۴، متغیرهای مورد مطالعه بهینه‌سازی شدند.

جدول شماره ۳: آزمایش‌های طراحی‌شده به همراه فاکتورهای بررسی‌شده و سطوح آن‌ها در کشت ناپیوسته باکتری اشریشیا کلی برای بهینه‌سازی OD القاشده و غلظت IPTG به منظور بیان پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc

فاکتور شماره آزمایش	OD القا	غلظت IPTG (میلی مولار)
۱	۴/۵	۰/۵
۲	۴/۵	۱/۰
۳	۱۰/۰	۰/۵
۴	۱۰/۰	۱/۰

ظرف فرمانتور حاوی محیط کشت سترون به روی فرمانتور نصب شد و سپس به مدت ۸ ساعت برای پلاریزه شدن، حس‌گر اکسیژن محلول فرمانتور روشن شد. سپس با تنظیم شرایط عملیاتی (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دور همزن ۵۰۰ دور در دقیقه و درصد اکسیژن محلول ۴۰ درصد و pH = ۷/۱)، مایه تلقیح در شرایط سترون به فرمانتور اضافه شد و فرمانتور شروع به کار کرد.

pH تخمیر با افزودن خودکار محلول آمونیوم (۲۵ درصد) و اسید کلریدریک (۲۵ درصد) در ۷/۱ کنترل شد. میزان اکسیژن محلول در ۴۰ درصد غلظت اشباع با

تغییرات خودکار سرعت هم زدن بین دو حد پایین و بالا حفظ شد. در حد پایین، دور هم زدن دارای حداقل سرعت چرخش انتخاب شد. چون در فرمانتور سرعت هوادهی (یک لیتر در دقیقه) ثابت بود، اکسیژن محلول با افزایش رشد سلولی کاهش یافت. پایین‌تر آمدن اکسیژن محلول از نقطه تنظیم‌شده سبب افزایش خودکار سرعت هم زدن تا بالاترین حد تنظیم‌شده گردید. در صورتی که بالاترین سرعت هم زدن جوابگوی میزان تنظیم‌شده اکسیژن محلول نبود، سرعت هم زدن تا ۳ لیتر در دقیقه افزایش یافت. در نهایت چنان چه سیستم دچار کمبود اکسیژن بود، مخلوطی از هوا و اکسیژن به فرمانتور تزریق گردید. کف تولیدشده در فرمانتور با افزودن سیلیکون سترون‌شده کنترل شد. برای القای کشت در فرمانتور از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار IPTG در ODهای مشخص (۴/۵ و ۱۰) استفاده گردید. اتمام فرایند از طریق افزایش اکسیژن محلول (به دلیل اتمام منبع کربن و کاهش مصرف اکسیژن توسط باکتری) یا pH (به دلیل مصرف منابع نیتروژنی به جای کربنی و تولید ترکیبات آمونیومی) مشخص شد و در این شرایط فرایند خاتمه داده شد (۱۲، ۱۱).

برای دستیابی به دانسیته سلولی بالا از کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با روش خوراک‌دهی نمایی در حجم ثابت کشت استفاده شد. در این روش با اتمام منبع کربن و اتمام کشت ناپیوسته، خوراک‌دهی بر اساس مقدار پیش‌بینی‌شده آغاز گردید. در طول فرایند با افزایش نمایی توده سلولی، میزان خوراک ورودی به فرمانتور نیز به صورت نمایی افزایش یافت (۱۳).

به منظور محاسبه میزان بیان پروتئین نوترکیب از دو پارامتر میزان غلظت کل پروتئین محلول موجود در نمونه و درصد باند پروتئین مورد نظر، استفاده شد. میزان پروتئین محلول کل توسط روش پروتئین‌سنجی Bradford محاسبه شد (۱۴). برای محاسبه درصد باند پروتئین نوترکیب نسبت به کل باندهای پروتئینی از روش دانسیتومتری ژل‌های الکتروفورز توسط دستگاه فارماسیا (Pharmacia,Bromma,Sweden) استفاده شد. در این روش سطح زیر منحنی باند مورد نظر نسبت به سطوح زیر منحنی کل پروتئین‌های محلول موجود در نمونه به دست آمد. از ضرب غلظت کل پروتئین و درصد باند مورد نظر میزان میلی‌گرم پروتئین نوترکیب هدف محلول در فضای سیتوپلاسمی محاسبه شد (۱۴، ۵، ۴).

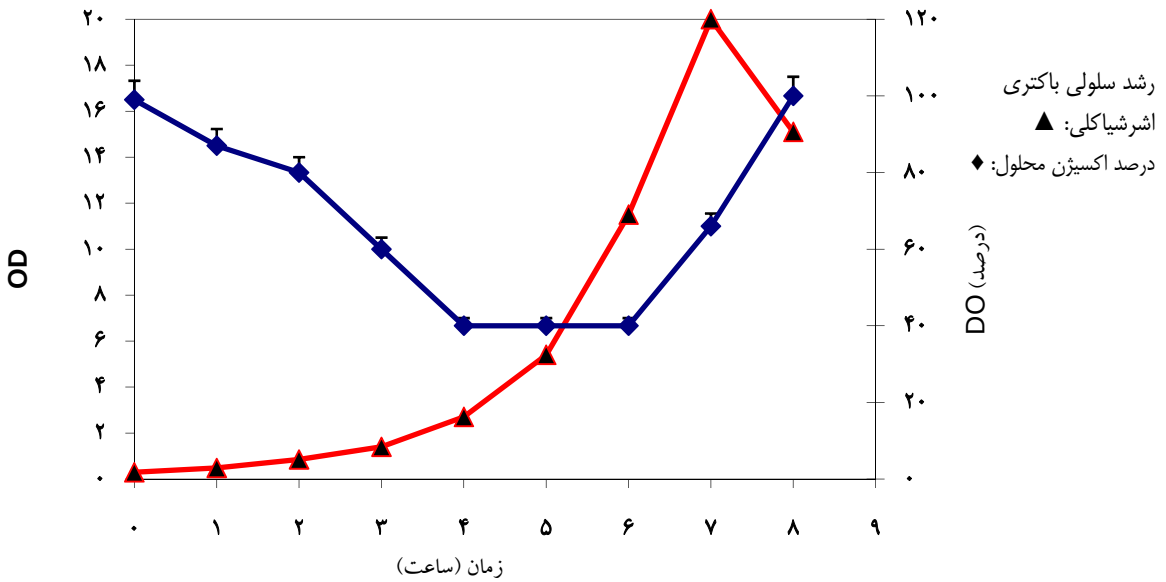
یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی رشد باکتری نوترکیب در کشت ناپیوسته نشان داد که باکتری پس از ۴ ساعت و در OD حدود ۳ در ابتدای فاز لگاریتمی قرار گرفت. همچنین پس از ۷ ساعت از شروع فرایند، منبع کربن تمام شد و رشد باکتری متوقف گردید. پس از گذشت ۴ ساعت از کشت باکتری و با افزایش رشد سلولی میزان اکسیژن محلول کاهش یافت و به پایین‌ترین حد خود یعنی ۴۰ درصد اشباع رسید. در این شرایط دور هم زدن نیز در حداکثر بود (نمودار شماره ۱).

نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که در زمان ۴ تا ۶ ساعت از شروع فرایند، بالاترین سرعت هم زدن نیز جوابگوی رشد سلولی نبود و میزان اکسیژن محلول در ۴۰ درصد یعنی کمترین حد خود بود. در نهایت در این زمان (۶ ساعت بعد از شروع فرایند) به سبب جلوگیری از کمبود اکسیژن، اکسیژن به صورت دستی به فرمانتور تزریق گردید.

پس از انجام آزمایشات مربوط به بهینه‌سازی متغیرهای زمان القا و مقدار غلظت IPTG به کمک روش آماری Taguchi، تعیین غلظت پروتئین نوترکیب و تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که OD برابر ۱۰ (دارای اهمیت ۴۳/۲ درصد) و غلظت یک میلی‌مولار IPTG (دارای اهمیت ۵۶/۸ درصد) برای بیان پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در کشت ناپیوسته بهینه است. در شرایط بهینه ۶۲ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر محیط کشت حاصل گردید (جدول شماره ۴).

برای دستیابی به دانسیته سلولی بالا از کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با روش خوراک‌دهی نمایی در حجم ثابت کشت استفاده شد. در این روش با خاتمه یافتن کشت ناپیوسته، خوراک‌دهی بر اساس مقدار پیش‌بینی‌شده آغاز شد. در طول فرایند با افزایش نمایی توده سلولی، میزان خوراک ورودی

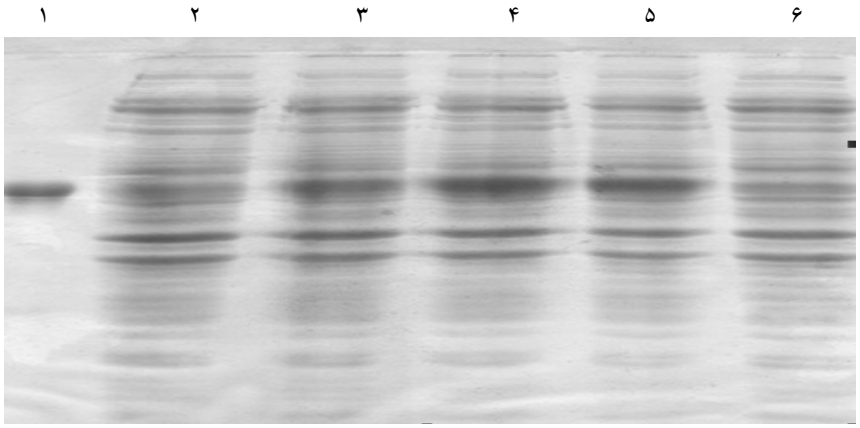


نمودار شماره ۱: نمودار رشد سلولی باکتری اشرشیا کلی و درصد اکسیژن محلول در کشت ناپیوسته فرمانتور

جدول شماره ۴: نتایج آزمایش‌های کشت ناپیوسته باکتری اشریشیا کلی برای بهینه‌سازی OD القاشده و غلظت IPTG در فرمانتور به منظور بیان پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc

شماره آزمایش	بیشترین پروتئین BoNT/A-Hc محلول در فضای سیتوپلاسمی (میلی‌گرم در لیتر)	میزان پروتئین محلول کل سلولی (میلی‌گرم در لیتر)
۱	۰/۰	۲۴۰
۲	۳۸/۲	۴۷۰
۳	۳۴/۳	۳۸۰
۴	۶۲/۴	۵۲۰

به فرمانتور نیز به صورت نمایی افزایش یافت به طوری که سرعت رشد ویژه باکتری کمتر از ۰/۲ کنترل شد. بعد از ۱۵ ساعت از شروع فرایند OD کشت به ۱۰۰ رسید و با غلظت یک میلی‌مولار IPTG القا شد. بعد از القا سرعت رشد ویژه باکتری کاهش یافت و با گذشت ۴ ساعت زمان بعد از القای فرایند، خاتمه یافت. الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید نمونه‌های بعد از القا، دانسیتومتری ژل SDS-PAGE (تصویر شماره ۱) و روش پروتئین‌سنجی برادفورد نشان داد که مقدار تولید پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc محلول در فضای سیتوپلاسمی در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا به ترتیب ۱۷۱، ۳۴۱، ۴۸۶ و ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر است و بیشترین میزان بیان مربوط به نمونه ساعت سوم بعد از القا بود.



تصویر شماره ۱: تصویر ژل SDS-PAGE، ۱۲/۵ درصد مربوط به بررسی بیان پروتئین نوترکیب ۵۰ کیلودالتونی BoNT/A-Hc در سویه اشرشیا کلی نوترکیب در کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در فرمانتور ۲ لیتری. ستون ۶ نمونه قبل از القا، ستون ۱ پروتئین استاندارد ۵۰ کیلودالتونی و ستون۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب نمونه زمان‌های ۱ تا ۴ ساعت بعد از القا هستند

جدول شماره ۵: مقایسه شاخص‌های فرایند تولید پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در کشت‌های مختلف فلاسک، ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده باکتری اشریشیا کلی

عنوان	فلاسک	کشت ناپیوسته	کشت ناپیوسته خوراک‌دهی شده
مقدار گلوکز مصرف‌شده در فرایند (گرم در لیتر)	۱۵/۰	۱۵/۰	۱۸۸/۵
دانسیته نوری در پایان فرایند	۳/۵	۱۳/۰	۱۰۰/۰
دانسیته سلولی در پایان فرایند (گرم در لیتر)	۱/۷۵	۶/۵	۵۰/۰
زمان فرایند (ساعت)	۱۸/۰	۱۲/۰	۲۱/۰
غلظت BoNT/A-Hc محلول در فضای سیتوپلاسمی (میلی‌گرم در لیتر)	۵۲/۰	۶۲/۰	۴۸۶/۰
بهره‌دهی حجمی پروتئین (میلی‌گرم در لیتر در ساعت)	۲/۸	۵/۱	۲۳/۱

همچنین میزان بهره‌دهی حجمی در کشت‌های فلاسک، ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، به ترتیب ۲/۸، ۵/۱ و ۲۳/۱ بود (جدول شماره ۵).

بحث

در تحقیق حاضر با سویه *E. coli BL21 (DE3)* و پلاسمید pET28a تحت القای IPTG در محیط کشت بهینه‌شده M9 مقدار ۴۸۶ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در فرایندی به مدت ۲۱ ساعت حاصل گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده و با تراکم سلولی بالا می‌توان به میزان بالایی از محصول نوترکیب دست یافت به طوری که تفاوت بین میزان بهره‌دهی حجمی در کشت ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده قابل توجه بود.

اولین بار در دهه ۱۹۴۰ میلادی مطالعه‌ها و تلاش‌های زیادی برای تولید واکسن با روش‌های متداول تهیه توکسویید، برای مقابله با بیماری مرگ‌آور بوتولیسم مورد توجه قرار گرفت (۱۵، ۱). با پیشرفت‌های اخیر زیست فناوری و مهندسی ژنتیک، گرایش به سمت تولید واکسن‌های نسل جدید (واکسن‌های نوترکیب) بر ضد بوتولیسم به وجود آمده است. واکسن‌های نوترکیب به دلیل عدم نیاز به امکانات و فضاهای آزمایشگاهی، عدم نیاز به کشت مقادیر بالای باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، عدم استفاده از مواد شیمیایی مضر جهت تولید واکسن، تسهیل مراحل خالص‌سازی و کاهش بروز واکنش‌های ناخواسته نسبت به واکسن‌های توکسوییدی برتری دارند (۱۵، ۸، ۴).

با توجه به مکانیسم مولکولی عملکرد توکسین، نقطه آغازین سیر مراحل بیماری، اتصال توکسین به سلول‌های هدف در محل اتصال اعصاب و عضله می‌باشد. بیشتر مطالعه‌ها در زمینه تولید واکسن نوترکیب و آنتی‌بادی بر روی بخش اتصال‌دهنده توکسین متمرکز شده‌اند تا بتوان با تولید آنتی‌بادی بر علیه این بخش مانع از اتصال اولیه توکسین به گیرنده سطح سلولی شد و بدین طریق از ورود سم به داخل سلول جلوگیری کرد (۷، ۵، ۲، ۱).

مطالعات نشان داده است پروتئین انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم دارای شاخص‌های آنتی‌ژنیک است و از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار می‌باشد و ایمنی‌زایی آن در حیوانات آزمایشگاهی نیز تأیید شده است (۲)، ولی یکی از مشکلات برای تولید واکسن نوترکیب علیه این قطعه، میزان کم بیان پروتئین نوترکیب در سیستم‌های بیانی است، زیرا ژن این قطعه غنی از نوکلئوتیدهای AT است (۵، ۴). Yu و همکاران موفق شدند مقدار ۳۰ میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت از همین پروتئین نوترکیب تولید کنند (۱۶). همچنین، در مطالعات فاطمی و همکاران (۱۵) و یاری و همکاران (۵)، بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب ۵۲ میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت باکتری اشرشیا کلی بود. از دیگر مطالعات انجام‌شده در این خصوص می‌توان به نتایج منصور و همکاران اشاره کرد که موفق شدند میزان ۴۰ میلی‌گرم در لیتر از پروتئین نوترکیب بخشی از ناحیه کربوکسیلیک زنجیره سنگین نوروتوکسین

کلستریدیم تیپ E در باکتری اشریشیا کلی تولید نمایند (۱۷). به منظور افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشرشیا کلی، محققین از روش کشت با تراکم سلولی بالا استفاده می‌کنند که افزایش بهره‌دهی کلی پروتئین‌های درون سلولی با افزایش تراکم سلولی به دست می‌آید (۱۸). اگر چه از سال‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۰ میلادی مراحل کشت باکتری جهت تولید انبوه توکسین کلستریدیوم، تخلیص توکسین و تبدیل آن به یک فرآورده توکسوییدی انجام گرفت (۲۰، ۱۹، ۳، ۱)، ولی تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تولید انبوه بخش‌های غیر سمی توکسین دریافت نشده است. هر چند تحقیقات زیادی در مورد بیان بخش‌های غیر سمی در میزبان‌های مختلف از جمله اشریشیا کلی و مخمر Pichia pastoris و حتی سیستم‌های بیانی ویروس‌های حشرات صورت گرفته است ولی هدف از این مطالعات شناخت مکانیسم‌های مولکولی تأثیر این بخش‌ها بر سیستم عصبی و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها بوده است (۷-۲).

در مقایسه با مطالعات دیگر، در این تحقیق که تولید بخش کربوکسیلیک زنجیره سنگین نوروتوکسین با استفاده از روش کشت با تراکم سلولی بالا برای اولین بار گزارش می‌شود، سعی شد راهکارهای لازم برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc در نظر گرفته شود. به این منظور از میزبان باکتریایی *E. coli BL21(DE3)* استفاده شد. تجربه نشان داده است که اشریشیا کلی عمومی‌ترین میزبان برای بیان پروتئین‌های نوترکیب است. همچنین از وکتور pET28a استفاده شد که قدرتمندترین سیستمی است که تا حال حاضر به منظور همسانه‌سازی و بیان پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیا کلی طراحی شده است. در این تحقیق با توجه به کاربرد دارویی و پزشکی پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc و همچنین برای رسیدن به تراکم سلولی بالا از محیط کشت شیمیایی بهینه‌شده M9 (۵) به دلیل مشخص بودن ترکیب شیمیایی و قابلیت کنترل بهتر غلظت مواد غذایی در این مطالعه استفاده گردید.

در تحقیقات مشابهی که بابایی‌پور و همکاران انجام داده‌اند از سویه *E. coli BL21(DE3)* و پلاسمید pET23a تحت القای IPTG برای بیان اینترفرون گامای انسانی در محیط کشت M9 اصلاح‌شده، استفاده گردید. در این تحقیق با انتخاب استراتژی‌های مختلف از جمله سرعت‌های متغیر خوراک‌دهی (بیشینه سرعت خوراک‌دهی در شروع فرایند و کمینه سرعت خوراک‌دهی بعد از القا) و کنترل مهارکننده‌هایی مثل استات و آمونیوم، به تراکم سلولی بالای باکتری (۱۱۵ گرم در لیتر وزن خشک سلولی) دستیابی شد و ۴۲/۵ گرم در لیتر پروتئین اینترفرون گاما در فرایندی به مدت ۱۶/۵ ساعت تولید گردید (۱۳). پیشنهاد می‌گردد، در تولید صنعتی این پروتئین و حتی پروتئین‌های دیگر برای رسیدن به تراکم سلولی بالا دقت بیشتری در انتخاب سرعت‌های مختلف خوراک‌دهی قبل و بعد از القا و همچنین کنترل مهارکننده‌های رشد باکتری و بیان پروتئین نوترکیب، مبذول گردد. در هر صورت از آن جا که تاکنون هیچ گزارشی از کشت با تراکم سلولی بالا برای تولید BoNT/A-Hc منتشر نشده است، تولید این پروتئین با استفاده از این فناوری در محیط کشت با ترکیبات مشخص می‌تواند گام بزرگی در جهت تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم باشد.

در این تحقیق رشد باکتری در کشت ناپیوسته فرمانتور و در محیط کشت ساده و بهینه‌شده M9 بررسی شد و منحنی رشد باکتری مشخص گردید. تأثیر متغیرهای زمان القا و غلظت IPTG بر بیان فرم محلول BoNT/A-Hc نیز بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد که در شرایط بهینه مقدار ۶۲ میلی‌گرم پروتئین محلول BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر محیط کشت حاصل گردید. در نهایت در کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با تراکم سلولی بالا (دانسیته سلولی ۱۰۰) مقدار ۴۸۶ میلی‌گرم پروتئین نوترکیب BoNT/A-Hc به ازای یک لیتر محیط کشت حاصل گردید. با توجه به بهینه‌سازی شرایط تولید این پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی و البته نیمه صنعتی با استفاده از فناوری کشت‌های با تراکم سلولی بالا، پیشنهاد می‌گردد میزان ایمنی‌زایی این پروتئین نوترکیب نیز مطالعه گردد (در حال بررسی توسط نویسندگان این مقاله است)

تا بتوان گام بزرگی در جهت تولید واکسن نوترکیب علیه بوتولیسم برداشته شود.

سپاسگزاری

این مطالعه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، گروه صنایع تخمیری در طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۷ به شماره ۳۴۰۹ انجام گرفت. حمایت‌کننده مالی این تحقیق، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بود. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از راهنمایی‌های علمی و مساعدت‌های همکاران محترم گروه صنایع تخمیری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، به ویژه جناب آقای مهندس حسن حبیب قمی، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Yu YZ, Li N, Zhu HQ, Wang RL, Du Y, Wang S, et al. The recombinant Hc subunit of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate. Vaccine 2009; 27(21): 2816-22.
2. Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16: 19-49.
3. Chen R, Shi J, Cai K, Tu W, Hou X, Liu H, et al. Improved soluble expression and characterization of the Hc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A in Escherichia coli by using a PCR-synthesized gene and a Trx co-expression strain. Protein Expr Purif 2010; 71(1): 79-84.
4. Li L, Singh BR. High-level expression, purification, and characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. Protein Expr Purif 1999; 17(3): 339-44.
5. Yari K, Fatemi SS, Tavallaei M. Optimization of the BoNT/A-Hc expression in recombinant Escherichia coli using the Taguchi statistical method. Biotechnol Appl Biochem 2010; 56(1): 35-42.
6. Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, Middlebrook JL. Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype a expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. Infect Immun 1995; 63(7): 2738-42.
7. Yari K, Fatemi SS, Tavallaei M. High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of Escherichia coli. Bioprocess Biosyst Eng 2012; 35(3): 407-14.
8. Zhou Y, Singh BR. Cloning, high-level expression, single-step purification, and binding activity of His6-tagged recombinant type B botulinum neurotoxin heavy chain transmembrane and binding domain. Protein Expr Purif 2004; 34(1): 8-16.
9. Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. Appl Environ Microbiol 2000; 66(8): 3166-73.
10. Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, et al. Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. FEBS Lett 2004; 572(1-3): 299-306.
11. Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. Chem Eng Sci 2006; 61(3): 876-85.
12. Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Bahrami A, Maghsoudi N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of Escherichia coli. Biotechnol Lett 2003; 25(23): 1989-92.
13. Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robatjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N. Over-production of human interferon-Y by HCDC of recombinant Escherichia coli. Process Biochemistry 2007; 42(1): 112-7.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, NY: Cold Spring Harbor; 1989. p. 154-60.
15. Fatemi S, Yari K, Tavallaei M, Kahrizi D. Expression of recombinant Hc domain of Clostridium botulinum neurotoxin An in E. coli and its purification as a vaccine candidate against botulism. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2011; 16(2): 36-44. (Persian).
16. Yu YZ, Sun ZW, Wang S, Yu WY. High-level expression of the Hcc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A in Escherichia coli and its immunogenicity as an antigen. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2007; 23(5): 812-7.
17. Mansour AA, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal heavy chain of C. botulinum neurotoxin type E. Biologicals 2010; 38(2): 260-4.
18. Shojaosadati SA, Varedi Kolaei AM, Babaeipour V, Farnoud AM. Recent Advances in High Cell Density Cultivation for Production of

Recombinant Protein. Iran J Biotech 2008; 6(2): 63-84.
19. Zhou H, Zhou B, Pellett S, Johnson EA, Janda KD. Selection and characterization of a human monoclonal neutralizing antibody for Clostridium Botulinum neurotoxin serotype B. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19(3): 662-4.
20. Gao YL, Gao S, Kang L, Nie C, Wang JL. Expression of Hc fragment from Clostridium botulinum neurotoxin serotype B in Escherichia coli and its use as a good immunogen. Hum Vaccin 2010; 6(6): 462-6.