نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

تاثیر اسیدهای آمینه بر بیان و انتقال hGM-CSF در فرایند کشت ناپیوسته

سید صفاعلی فاطمی*، جعفر کیانی، مهدی دشتبان و باقر یخچالی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، گروه زیست فرایند

sfatemi@nrcgeb.ac.ir

چکیده

محیطهای کشت معین دارای مزایای زیادی نسبت به انواع نیمه پیچیده و پیچیده برای تولید پروتئینهای نوترکیب دارویی هستند. در این تحقیق تاثیر اسیدهای آمینه سرین، لوسین، گلوتامیک اسید، اسپارتیک اسید و فنیل آلانین بر بیان و انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی باکتری اشریشیاکلی نوترکیب در یک محیط کشت معین بررسی شده است. نتایج نشان داد که افزودن اسیدهای آمینه بر اساس موازنه جرمی، پس از القای کشت سبب جبران ضعف سلول برای بیان و انتقال hGM-CSF پری پلاسمی شده و بازده رشد سلولی را ۲/۵ برابر افزایش می دهد

کلمات کلیدی: اسیدهای آمینه، hGM-CSF، اشریشیاکلی نوترکیب، محیط کشت معین، تخمیر ناپیوسته

مقدمه

بر اساس طبیعت محیط‌های کشت، آنها را به سه دسته با ترکیب شیمیایی مشخص یا معین[1]، با ترکیب شیمیایی نیمه پیچیده[2] و با ترکیب شیمیایی غیرمشخص یا پیچیده[3] تقسیم‌بندی می‌کنند. در محیط‌های کشت شیمیایی مشخص، ترکیب شیمیایی و غلظت مواد مغذی محیط کشت کاملاً مشخص و ثابت می‌باشد. در مقابل، ترکیب شیمیایی و کیفیت محیط‌های کشت پیچیده و نیمه پیچیده، نامشخص و متغیر است که این عامل موجب کاهش تکرارپذیری فرایندهای تخمیری می‌شود. استفاده از محیط‌های کشت شیمیایی مشخص دارای مزایای متعددی نسبت به محیط‌های کشت پیچیده می‌باشد که از آن جمله می‌توان به امکان افزایش تکرارپذیری و ثبات فرایند تخمیر، اندازه‌گیری و کنترل بهتر شرایط تخمیر، بهبود عملیات افزایش مقیاس، بهبود فرایندهای پایین‌دستی و مطابقت با قوانین و مقررات عملیات تولید بهینه[4] (GMP) اشاره کرد (۱و۲).

فاکتور تحریک کننده کلنی های گرانولوسیت و ماکروفاژ (GM-CSF)[5] یک گلیکوپروتئین۱۴ تا ۳۵ کیلو دالتونی است که می‌تواند تکثیر و تمایز سلولهای زاینده گرانولوسیت و ماکروفاژ را تحریک کند(۳). این پروتئین در درمان بیماریهایی نظیر کمی تعداد سلول های خونی، درمان سندرم های نقصان مغز استخوان و افزایش تعداد و توان گرانولوسیتها در بیماران ایدزی به کار می رود(۴).

باکتری اشریشیاکلی بواسطهٔ رشد سریع، خصوصیات مشخص و قابلیت بیان پروتئین در موقعیت های مختلف سلولی نظیر سیتوپلاسم، پری پلاسم، سطح سلول و انتقال به محیط کشت یکی از مناسبترین میزبانها برای تولید پروتئینهای نوترکیب است(۵).

یکی از موقعیت های مناسب برای بیان پروتئین در باکتری اشریشیاکلی، فضای پری پلاسمی است. این فضا بین غشای سیتوپلاسمی و دیواره سلولی باکتری های گرم منفی قرار دارد. ترشح پروتئین هدف به فضای پری پلاسمی راهکار مطلوبی است که علاوه بر تسهیل فرایندهای پایین دستی سبب تقویت ساختار پروتئین و محافظت در مقابل تجزیه پروتئولیتیکی می شود(۵). چند مسیر برای انتقال پروتئینها از سیتوزول به فضای پری پلاسمی شناسایی شده که عبارتند از: مسیر وابسته به SecB، مسیر وابسته به ذره شناساگر (SRP)و مسیر Twin-Arg که اخیراً مورد بررسی قرار گرفته است .

در مسیر وابسته به SecB (به عنوان مثال زمانی که از پپتید نشانه *pel*B در بالادست ژن مولد پروتئین هدف استفاده می شود)، ابتدا چاپرون SecB به ناحیهٔ بالغ پیش پروتئین متصل شده و آن را به غشای سیتوپلاسمی و در مجاورت پروتئین سطحی SecA هدایت می کند. SecA پروتئینی است با خاصیت ATPase و جزو پروتئین‌های سطحی غشا که به پپتید نشانه و ناحیهٔ بالغ پیش پروتئین متصل شده و انرژی حاصل از هیدرولیز ATP را برای انتقال پیش پروتئین به کانال عرضی SecYEG تأمین می‌نماید. چرخهٔ

1- Chemically defined or synthetic media
2 - Semi complex
3 - Undefined or complex media
4- Good manufacturing practice
5- Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

تکراری اتصال SecA به پیش پروتئین، اتصال و هیدرولیز ATP و انفصال SecA از پیش پروتئین تا زمانی که کل پیش پروتئین از عرض غشاء عبور کند، ادامه می یابد (۶).
معمولا از راهکارهایی چون بهینه سازی محیط و روش کشت، اصلاح سویه میزبان و کنترل سیستم بیانی برای بهینه سازی تولید پروتئین های نوترکیب استفاده می شود (۷). در بسیاری از موارد محیط کشتهای معین جوابگوی بیان بالا در پروتئینهای سیتوپلاسمی هستند (۸). اما در تولید پروتئینهای پری پلاسمی اغلب محیط کشتهای پیچیده و یا نیمه پیچیده استفاده می شود (۹). انتقال پروتئین به فضای پری پلاسمی یک فرایند انرژی خواه است و در برخی موارد محیط کشت معین قادر به تامین این انرژی نیست و بایستی محیط کشت با استفاده از ترکیباتی مثل عصاره مخمر، پپتون و غیره غنی سازی شود (۹). در برخی از تحقیقات برای افزایش بیان پروتئینهای سیتوپلاسمی نوترکیب از افزایش جهت دار اسیدهای آمینه استفاده شده است(۱۰ و ۱۱).
پژوهشهای گذشته نشان داد که انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی با استفاده از محیط کشت معین حاوی گلوکز (به عنوان منبع کربن) امکان پذیر نیست (۹). بنابراین در این تحقیق تاثیر افزایش جهت دار اسیدهای آمینه روی بیان و انتقال hGM-CSF برای دستیابی به یک محیط کشت معین بررسی شده است.

مواد و روشها

میکروارگانیسم

باکتری مورد استفاده *E.coli* BL21(DE3) حامل پلاسمید pET-26a(+) دارای ژن های *hgm-csf* و مقاومت به کانامایسین بود که در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ساخته شده است(۱۲). این باکتری در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شد .

محیط کشت

محیط کشت LB آگار حاوی ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم NaCl و ۱۵ گرم آگار به ازای یک لیتر محیط برای کشت باکتری در پلیت استفاده شد. محیط کشت (F) مورد استفاده در فرمانتور حاوی ۱۹/۹۶گرم KH_2PO_4، ۶ گرم $(NH_4)_2HPO_4$، ۱/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۴۰ گرم گلیسرول به عنوان منبع کربن و عناصر کم مقدار(trace element) با ترکیب ۱۴/۱ میلی گرم EDTA، ۲/۵ میلی گرم $CoCl_2.6H_2O$، ۱۵ میلی گرم $MnCl_2.4H_2O$، ۱/۵ میلی گرم $CuCl_2.2H_2O$، ۳ میلی گرم H_3BO_3، ۲/۱ میلی گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$، ۳۳/۸ میلی گرم $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ و ۱۰۰/۸ میلی گرم Fe(III)citrate در لیتر بود (۱۳). یکی از کشتها با استفاده از غلظت ۱۰ گرم در لیتر پپتون غنی شد. محیط کشتها در دمای ^oC ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند.
برای تهیه مایه تلقیح، کلنی رشد کرده از پلیت LB آگار به محیط کشت معین (محیط فوق بدون پپتون با غلظت ۱۵ گرم در لیتر گلیسرول) منتقل شده و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ^oC ۳۰ با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه هم زده شد. بذر حاصل برای تلقیح به فرمانتور استفاده شد.

کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان عامل انتخابی بـه محـیط کـشتهای پلیـت و مایـه تلقیح افزوده می شد.

از ایزوپروپیل بتا-د-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت ۰/۵ میلی مولار برای القا کشت و بیان پروتئین GM-CSF انسانی استفاده شد. اسیدهای آمینه مورد نظر در زمان القای کشت به همراه IPTG به فرمانتور اضافه شدند. برای استریل نمودن کانامایسین، IPTG و اسیدهای آمینه از فیلتر استریل ۰/۲ میکرون استفاده شد.

فرمانتور

برای انجام آزمایشها از فرمانتور ۲ لیتـری Bioflo 3000 سـاخت شـرکت NEW BRUNSWICK مجهـز بـه کنترل دما، pH، دور همزن، آنتی فوم و DO استفاده شـد. مقـدار DO مـورد نظـر از طریـق برقـراری رابطـه منطقی بین سرعت هم زدن و اختلاط گازهای هوا و اکسیژن تنظیم می شد. فرایند تخمیر در دمـای ^{O}C ۳۰، pH ۶/۹ ، همزدن با دامنه ۵۰۰ تا ۹۰۰ دور بر دقیقه و DO معادل ۴۰٪ غلظـت اشـباع اکـسیژن انجـام شـد (۱۴).

آنالیزها

میزان رشد باکتری در ساعتهای مختلف کشت با استفاده از اندازه گیری دانسیته نوری نمونه هـای فرمـانتور در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. اندازه گیری وزن خشک باکتری نشان داد که هر یک واحد OD معادل ۰/۵ گرم سلول خشک است. hGM-CSF پری پلاسمی با استفاده از شوک اسمزی (۱۵) از کشتهای القا شده استخراج و با استفاده از روش دانسیتومتری ژل الکتروفورز، درصد نسبی آن در مجموعه پروتئینهـای محلـول پری پلاسمی تعیین شد.

نتایج و بحث

بررسی مطالعات گذشته نشان می داد که سویه نوترکیب در محیط کشت معین رشد نموده و hGM-CSF را بیان می کند. اما نتایج شوک اسمزی نشان داد که پروتئین بیان شده در این شرایط قابل استخراج نبوده و احتمالا سلول توان لازم برای پردازش و انتقال کامل پروتئین به فضای پری پلاسمی را ندارد. برای بررسی و رفع این مشکل طی پژوهشی محیط کشت توسط عصاره مخمر و پپتون غنی سازی شد. نتایج نشان داد که تنها پپتون در پردازش و انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی موثر است (۹). بنابراین محیط کشت با ترکیب نیمه پیچیده (محیط معین+ پپتون) در تحقیقات بعدی استفاده شد (۱۳). از آنجا که ترکیب محیط کشتهای نیمه پیچیده به خوبی روشن نیست، قدرت مانور و تکرار پذیری فرایند کم می شود. بنابراین در این تحقیق سعی شده تا ترکیب پیچیده پپتون با مقادیر مشخصی از اسیدهای آمینه جایگزین شود.

بررسی نمودار رشد، بیان و انتقال hGM-CSF در محیط کشت معین

برای انجام این آزمایش محیط کشت F با ترکیب شیمیایی مشخص در یک بیوراکتور ۲ لیتری توسط بذر ۱۴ ساعته تلقیح و رشد باکتری در آن ردیابی شد. زمانی که OD کشت به حدود ۷ رسید از غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG برای القای کشت استفاده و پس از حدود سه ساعت فرایند خاتمه یافت. نمودار رشد سلولی در

این فرایند نشان داد که حداکثر وزن خشک سلولی در این حالت، حدود ۸ گرم بر لیتر می باشد که طی ۱۳ ساعت تخمیر حاصل شده است (شکل ۱). بررسی بیان پروتئینهای پری پلاسمی، پس از القای کشت نشان داد که سلول در بیان و انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی کم توان بوده و در عمل hGM-CSF بیان شده ۱۵ درصد از کل پروتئینهای پری پلاسمی را شامل شده است.

بررسی نمودار رشد، بیان و انتقال hGM-CSF در محیط کشت نیمه پیچیده (محیط F + پپتون)

شرایط این آزمایش نیز مشابه فرایند قبلی بود با این تفاوت که در اینجا پپتون با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر برای غنی سازی محیط کشت (۹) استفاده شد. نمودار رشد سلولی در این شرایط نشان داد که وزن خشک باکتری تا حدود ۲۰ گرم در لیتر افزایش یافته است (شکل ۱). بررسی دانسیتومتری ژل الکتروفورز از نمونه پری پلاسمی، وجود ۲۰ درصد hGM-CSF را معادل باند استاندارد نشان می دهد (شکل ۲).

بررسی نمودار رشد، بیان و انتقال hGM-CSF در محیط کشت معین غنی شده با اسیدهای آمینه

برای انجام این کار ابتدا فرضیات زیر در نظر گرفته شده است:

الف) وجود پپتید نشانه *pel*B در بالادست ژن *hgm-csf*، استفاده از مسیر وابسته به Sec را برای انتقال پروتئینهای پری پلاسمی در باکتری اشریشیاکلی نوترکیب آشکار می کند(۱۶). بنابراین انواع پروتئینهای Sec (A، B، Y، E و G) در فرایند انتقال درگیرند.

ب) بیان hGM-CSF به عنوان یک پروتئین خارجی، همزمان با پروتئین های مسیر Sec بخش مهمی از انرژی سلول را دریافت می کند.

ج) میزان پروتئینهای غشایی درگیر در انتقال پروتئینهای پری پلاسمی حداکثر ۱۰٪ است.

د) میزان بیان hGM-CSF در باکتری نوترکیب حداکثر ۳۰٪ است.

ه) بعد از القا تولید توده سلولی کم است و اسیدهای آمینه اضافه شده بیشتر صرف بیان پروتئینهای Sec و hGM-CSF:pelB می شوند.

با توجه به فرضیات فوق، ترکیب اسیدهای آمینه مربوط به مجموعه پروتئینهای Sec و پروتئین دورگه hGM-CSF:pelB از بانکهای اطلاعاتی استخراج و با استفاده از نرم افزار محاسبه گر خصوصیات پپتید[6] وزن مولکولی و درصد وزنی هر کدام از رشته های آمینواسیدی محاسبه شد(جدول ۱).

افزودن تمامی اسیدهای آمینه به محیط کشت مقرون به صرفه نبوده و این کار در مقیاسهای تولیدی عملی نیست. بنابراین بایستی راهکاری را در پیش گرفت تا بتوان نتایج را در مقیاس بالا استفاده نمود. همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می شود اسیدهای آمینه بر اساس مسیرهای بیوشیمیایی در ۵ خانواده تقسیم بندی شده اند. در این تحقیق سعی شده تا در هر خانواده اسید آمینه کلیدی انتخاب و در محیط کشت استفاده شود. بنابراین مسیرهای بیوشیمیایی سنتز اسیدهای آمینه مورد مطاله قرار گرفت.

در خانواده پیروات سرین به عنوان پیش ساز دو اسید آمینه دیگر عمل نموده و به نظر میرسد حضور آن در محیط کشت سبب تسهیل فرایند بیوسنتز این خانواده شود. بنابراین از خانواده پیروات، سرین انتخاب شد. در خانواده ۳-فسفوگلیسرات مبنای انتخاب بر اساس بیشترین مقدار اسید آمینه حاضر در پروتئینهای مجموعه

[6] - Peptide property calculator

Sec و hGM-CSF:pelB بود. با مراجعه به جدول ۱ به خوبی روشن است که اسیدآمینه لوسین دارای بیشترین مقدار (۱۳/۷٪ در hGM-CSF:pelB و ۹/۹٪ در مجموعه Sec) در پروتئینهای مورد نظر می باشد. بنابراین از خانواده ۳-فسفوگلیسرات، لوسین انتخاب شد. با نگاهی به مسیرهای بیوشیمیایی سنتز اسیدهای آمینه در خانواده گلوتامیک اسید مشخص شد که اسید آمینه سرگروه نقش کلیدی داشته و به نوعی پیش ساز سایر اسیدهای هم خانواده خود می باشد. بنابراین از این خانواده نیز گلوتامیک اسید انتخاب شد. در عین حال درصد وزنی این اسید آمینه در پروتئینهای مورد نظر بالا است و دلیل انتخاب آن را محکم می نماید. در خانواده آسپارتیک اسید نیز تمام اسیدهای آمینه از ال-اسپارتات منشا میگیرند و اگرچه مقدار اسید آمینه آسپارتیک اسید در پروتئینهای مورد نظر پایین است ولی به واسطه نقش مهم و کلیدی که دارد از این خانواده انتخاب شد. اسید آمینه های حلقوی پیش ساز همدیگر نیستند بنابراین از بین آنها فنیل آلانین با بیشترین حضور در پروتئینهای مورد نظر انتخاب شد

جدول۱- تعداد، وزن مولکولی و درصد وزنی اسیدهای آمینه مربوط به پروتئینهای Sec و hGM-CSF:pelB با تفکیک در گروههای هم خانواده

ino acid	MW	hGMCSF:pelB			Sec A, B, Y, E, G							
		Amino acid no.	MW* No	W%	Sec A	Sec B	Sec Y	Sec E	Sec G	Total	MW*no.	W%
PYROVATE FAMILY				**8.9**								**8.0**
Ser	105	9	802	4.8	45	7	23	4	10	89	7770	4.2
Gly	75	4	246	1.5	34	8	43	10	12	107	6128	3.3
Cys	121	4	436	2.6	6	1	2	0	0	9	946	0.5
3 PHOSPHO GLYSERATE FAMILY				**23.3**								**21.8**
Ala	89	15	1085	6.5	48	12	41	18	14	133	9474	5.1
Val	117	5	514	3.1	49	15	35	17	5	121	12703	6.8
Leu	131	20	2280	13.7	68	15	48	19	13	163	18453	9.9
GLUTAMIC ACID FAMILY				**30.6**								**21.7**
Glu	147	13	1696	10.2	70	16	14	5	4	109	14090	7.6
Gln	146	9	1171	7	34	10	21	2	4	71	9113	4.9
Pro	115	13	1280	7.7	18	10	20	2	5	55	5359	2.9
Arg	174	6	955	5.7	38	6	21	9	1	75	11733	6.3
ASPARTIC ACID FAMILY				**26.9**								**34.5**
Asp	133	4	478	2.9	64	8	7	2	2	83	9571	5.1
Asn	132	4	474	2.8	73	5	10	2	7	97	11086	6
Lys	146	7	915	5.5	60	3	17	4	5	89	11428	6.1
Met	149	6	805	4.8	14	3	16	4	5	42	5528	3
Thr	119	12	1231	7.4	46	8	25	11	8	98	9926	5.3
Ile	131	5	915	3.5	80	7	45	9	7	148	16757	9
CIRCULAR AMINO ACID FAMILY				**12.4**								**14.6**
Phe	165	5	754	4.5	35	7	32	3	6	83	12236	6.6
Tyr	181	3	508	3	37	5	15	2	1	60	9810	5.3
Trp	204	2	390	2.3	4	0	4	3	1	12	2252	1.2
His	155	3	429	2.6	14	1	4	1	0	20	2760	1.5

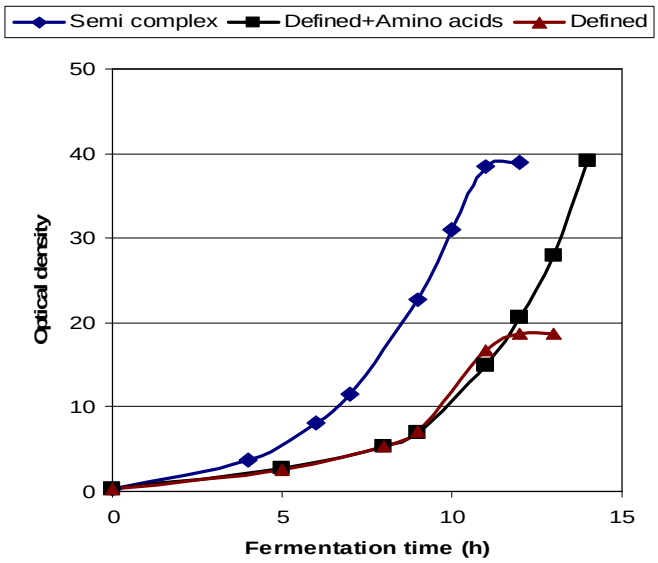
با توجه به فرضیات ج تا ه مقدار اسیدهای آمینه انتخاب شده با استفاده از موازنه جرم بر اساس دستیابی به حدود ۱۲ گرم سلول خشک (این مقدار بیشتر از میزان بدست آمده در عدم حضور اسیدهای آمینه در نظر گرفته شده است) محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۲- مقدار اسیدهای آمینه لازم برای افزایش به محیط کشت معین

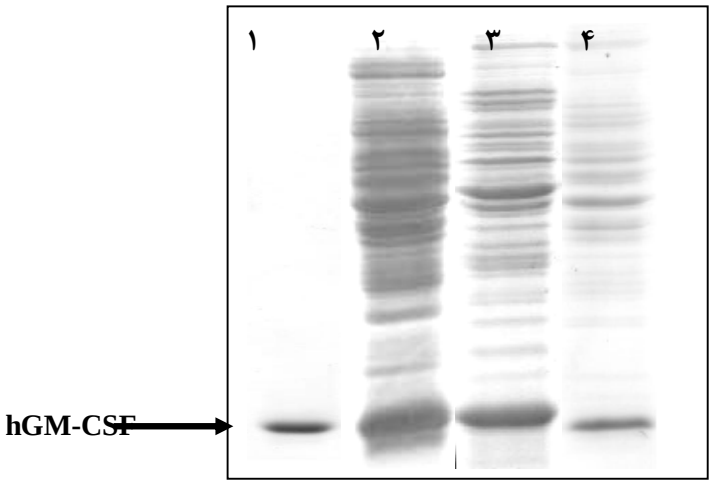
Amino acid	w% in hGM-SF:pelB	w% in Sec_{ABYEG}	g amino acid/l
Ser	4.8	4.2	0.11
Leu	13.4	9.9	0.30
Glu	10.2	7.6	0.23
Asp	2.9	5.1	0.08
Phe	4.5	6.6	0.24

مقادیر فوق بر اساس ۱۲ گرم وزن خشک سلولی محاسبه شده که ۵۰٪ آن را پروتئینهای کل سلول تشکیل داده اند.

روند انجام آزمایش به صورت مراحل قبلی بود با این تفاوت که اسیدهای آمینه مورد نظر در هنگام القا به محیط کشت اضافه شدند. بررسی نمودار رشد در این آزمایش نشان داد که وجود اسیدهای آمینه در محیط کشت سبب افزایش رشد شده و توده سلولی تا حد کشت حاوی پپتون بالا رفته است (شکل ۱). مقایسه نمودار رشد در سه حالت مختلف نشان می دهد که سرعت رشد در محیط حاوی پپتون نسبت به دو محیط دیگر بالاتر است. از طرفی افزایش اسیدهای آمینه به محیط معین بازده تولید بیومس را تا حد محیط کشت نیمه پیچیده بالا برده است. بنابراین می توان گفت آن بخش از اسیدهای آمینه که در شاخه رشد سلولی مصرف می شوند بیشتر از حد پیش بینی شده می باشند. استخراج پروتئینهای پری پلاسمی از کشت حاوی اسیدهای آمینه نیز نشان می دهد که حضور اسیدهای آمینه انتخاب شده در محیط کشت ضعف سلول نوترکیب برای بیان و انتقال hGM-CSF به پری پلاسم را جبران نموده است (شکل ۲).



شکل ۱- نمودار رشد سلولی سویه تولید کننده hGM-CSF در محیط کشتهای معین، حاوی پپتون و حاوی اسیدهای آمینه



شکل ۲- تصویر ژل SDS از پروتئینهای محلول در پری پلاسم باکتری اشریشیاکلی نوترکیب مربوط به فرایندهای ناپیوسته با محیط کشتهای مختلف

. ستون ۱: استاندارد hGM-CSF، ستون ۲: نمونه پری پلاسمی از کشت در محیط معین، ستون ۳: نمونه پری پلاسمی از کشت در محیط نیمه پیچیده حاوی پپتون، ستون ۴: نمونه پری پلاسمی از کشت در محیط معین حاوی اسیدهای آمینه

در جدول ۳ مقایسه ای بین درصد hGM-CSF پری پلاسمی و وزن خشک سلولی در محیط کشتهای مختلف ارائه شده است. ملاحظه می شود که محیط معین حاوی اسیدهای آمینه علاوه بر امکان پردازش و انتقال بیشتر hGM-CSF به پری پلاسم باعث افزایش بازدهی رشد تا ۲/۵ برابر شده است.

نتیجه گیری

۱- محیط کشت معین حاوی اسیدهای آمینه می تواند جایگزین مناسبی برای محیط پیچیده حاوی پپتون در بیان و انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی باکتری اشریشیاکلی نوترکیب باشد.

۲- اسیدهای آمینه افزوده شده علاوه بر تامین انرژی لازم جهت انتقال پروتئینها به پری پلاسم، باعث افزایش بازده رشد سلولی نیز شده اند.

۳- محیط کشت معین حاوی اسیدهای آمینه می تواند به خوبی در تولید hGM-CSF استفاده شود.

تشکر وقدردانی

از آقای علی اصغر کارخانه و خانم مریم شاه علی برای همکاری در انجام آزمایشها تشکر می کنیم.

منابع و مراجع

1. Rothen S. A., Sauer M., Sonnleitner B. and Witholt B., "Growth characteristics of Escherichia coli HB101[pGEc47] on defined medium", Biotechnol. Bioengin., 58, p. 92-100 (1998).

2. Seeger, A. Schneppe B., Maccarthy J. E. G. Dechwer W. and Rinas U., "Comparison of temperature-and isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant E. coli", Enz. Microb. Technol., 17, p. 947-953 (1995).

3. Seetharam, R. and Sharma, S.K. "Purification and Analysis of Recombinant proteins", First Edition, Marcell Dekker, New York, USA, p.170 (1991).

4. Weiss, M. and Belohradskey, B.H. "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). A variety of possible applications in clinical medicine", Infection 20, p. 581-583 (1992).

5. Makrides S. C., "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli", Microbiol. Rev., 60(3), p. 512-538 (1996).

6. Fekkes P. and Driessen A. J. M., "Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrain", MMBR, 63, p. 161-173 (1999).

7. Lee S. Y., "High cell-density culture of Escherichia coli", Trends Biotechnol. 14, p. 98-105 (1996).

8. Khalilzadeh R., Shojaosadati S.A., Bahrami A. and MAghsoudi N., "Overe-expression of recombinant human interferon-gama in high cell density fermentation of Escherichia coli", Biotechnol. Lett., 25, p. 1989-1992 (2003).

۹. فاطمی س. ص.، توفیقی داریان ج.، یخچالی ب.، شجاع الساداتی س. ع. و شاه علی م.، "تاثیر غنی سازی محیط کشت بر انتقال hGM-CSF به فضای پری پلاسمی در باکتری اشریشیاکلی نوترکیب"، مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد سوم، صفحات ۳۲۳-۳۲۵ (۱۳۸۲).

10. Ramirez D. M. and Bentley W. E., "Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition", Biotechnol. Bioeng., 41, 557-565 (1993).

۱۱. خلیل زاده ر.، شجاع الساداتی س.ع.، بهرامی ع. و مقصودی ن. " افزایش تولید اینترفرون-گامای انسانی در کشت باکتری اشریشیاکلی نوترکیب در محیط کشت شیمیایی مشخص"، خلاصه مقالات هشتمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، صفحه ۸۵ (۱۳۸۲).

12. Borjaliloo, S., Zomorodipour, A., Yakhchali, B., and Shojai, S., "Comparison of T7-and lac-based systems for the periplasmic expression of human granulocyte macrophage colony stimulating factor in Escherichia coli", I. J. Biotechnol, 1, p. 101-108 (2003).

۱۳. فاطمی س. ص.، "تولید ترشحی GM-CSF انسانی در فرایند کشت با تراکم سلولی بالای اشریشیاکلی نوترکیب"، رساله دکتری، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، (۱۳۸۲).

14. Fatemi S. S., Towfighi Darian J., Yakhchali B., Shojaosadati S. A. "Media and specific growth rate selection for high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli producing hGM-CSF in fed-batch process", Iranian J. Chem. Eng., 1, p. 47-56 (2004)

15. Fatemi S. S., Yakhchali B., Towfighi Darian J., Shojaosadati S. A. and Zomorodipour A., Karkhane A. and Rastgar Jazii F. " Selection of a Suitable Strain from Recombinant Escherichia coli Strains with the Same Genetic Structure Expressing Periplasmic hGM-CSF", J. Biosci. Bioeng., 96, p. 578-580 (2003).

16. Braun P., Gerritese G., Dijl J. V. and Quax W. J., "Improving protein secretion by engineering components of the bacterial translocation machinery", Curr. Opin. Biotechnol., 10, p. 376-381 (1999).