



نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

بهینه سازی تولید ترشحي GM-CSF انسانی در فرایند ناپیوسته با استفاده از اشريشیاکلی نو ترکیب

سید صفا علی فاطمی^{۱*}، باقر یخچالی^۱، جعفر توفیقی داریان^۲ و سید عباس
شجاع الساداتی^۲

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

۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی

sfatemi@nrcgeb.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، تاثیر غلظت گلیسرول، ماده القا کننده، ساکاروز و زمان القا بر فرایند بیان و انتقال GM-CSF انسانی به فضای پری پلاسمی باکتری اشريشیاکلی نو ترکیب در یک بیوراکتور هم زن دار ۲ لیتری در فرایند تخمیر ناپیوسته مطالعه شد. برای بهینه سازی چهار متغیر در سه سطح از طرح آزمایش به روش تاگوچی استفاده شد. پس از بهینه سازی غلظت ۴۰ گرم در لیتر گلیسرول، ۰/۵ میلی مولار ماده القا کننده و القا در ساعت ششم تخمیر به عنوان نقاط بهینه بدست آمدند. وجود ساکاروز در محیط کشت باعث تغییر شکل GM-CSF و کاهش تولید آن شد. در شرایط بهینه میزان GM-CSF انسانی تولید شده در پری پلاسم باکتری اشريشیاکلی و بهره دهی حجمی فرایند به ترتیب ۷۱ میلی گرم و ۶/۴۵ میلی گرم در لیتر در ساعت بدست آمد

کلمات کلیدی: GM-CSF، اشريشیاکلی نو ترکیب، پری پلاسم، بیوراکتور همزن دار، تخمیر ناپیوسته،

تاگوچی

مقدمه

فاکتور تحریک کننده کلنی های گرانولوسیت و ماکروفاژ (GM-CSF)^۱ یک گلیکوپروتئین ۱۴ تا ۳۵ کیلو دالتونی است که می تواند تکثیر و تمایز سلولهای زاینده گرانولوسیت و ماکروفاژ را تحریک کند (۱). 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 (۲).

باکتری اشیشیاکلی بواسطه 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 نو ترکیب است (۳). بیان GM-CSF انسانی برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ با استفاده از باکتری اشیشیاکلی انجام گرفت (۴). در سالهای اخیر مطالعاتی روی کلونینگ و بیان این پروتئین در سیستمهای بیانی مختلف باکتری اشیشیاکلی نو ترکیب در کشور انجام شده است (۵-۷).

یکی از موقعیت های مناسب برای بیان پروتئین در باکتری اشیشیاکلی، 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 (۳).

فرایند تولید پروتئینهای پری پلاسمی تابع عوامل مختلفی است که بایستی به نحو مطلوب ارزیابی و بهینه سازی شوند. انتخاب سویه مناسب یکی از قدمهای اساسی برای شروع بهینه سازی متغیرهای تولید است (۸). ترکیب محیط کشت می تواند به طور موثر میزان انتقال پروتئین به پری پلاسم را تحت تاثیر قرار دهد (۹). گلیسرول به عنوان منبع کربن با سرعت کمتری نسبت به گلوکز در متابولیسم سلولی وارد شده و بنابراین زمان لازم برای فرایند انتقال پروتئین به فضای پری پلاسمی بیشتر است (۱۰). زمان القا و میزان القا کننده عوامل مهمی در میزان بیان ژنهای القایی هستند که معمولا در بهینه سازی تولید پروتئینهای نو ترکیب مورد توجه قرار می گیرند (۱۱). استفاده از ترکیباتی نظیر ساکاروز در محیط کشت باکتری اشیشیاکلی برای افزایش فشار اسمزی در پری پلاسم و در نتیجه افزایش انتقال پروتئین ها به فضای پری پلاسمی گزارش شده است (۱۲).

در این تحقیق به منظور بهینه سازی بیان پری پلاسمی GM-CSF انسانی در فرایند ناپیوسته با استفاده از یک بیوراکتور هم زن دار، تاثیر متغیرهای میزان منبع کربن (گلیسرول)، زمان القا، غلظت القا کننده و غلظت ساکاروز با استفاده از طرح آزمایش به روش تاگوچی مورد مطالعه قرار گرفت.

¹ - Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

مواد و روشها

میکروارگانیزم

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 (۷). 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 مورد استفاده در فرمانتور حاوی ۱۳/۳ گرم KH_2PO_4 ، ۴ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ، ۱/۷ گرم اسید سیتریک، ۱/۲ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۰ گرم پپتون، غلظتهای مختلفی از گلیسرول به عنوان منبع کربن و عناصر کم مقدار (trace element) با ترکیب ۱۴/۱ میلی گرم EDTA، ۲/۵ میلی گرم $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۵ میلی گرم $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۵ میلی گرم $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۳ میلی گرم H_3BO_3 ، ۲/۱ میلی گرم $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۳/۸ میلی گرم $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و ۱۰۰/۸ میلی گرم $\text{Fe}(\text{III})\text{citrate}$ در لیتر بود (۱۰). در برخی آزمایشها ترکیب محیط کشت با غلظتهای مختلفی از ساکاروز همراه بود.

برای تهیه مایه تلقیح، کلنی رشد کرده روی 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 30°C با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه هم زده شد.

کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان عامل انتخابی به محیط کشتهای پلیت و مایه تلقیح افزوده می شد. محیط کشتهای در دمای 37°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند.

از ایزوپروپیل بتا-D-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظتهای مختلف برای القا کشت و بیان پروتئین GM-CSF انسانی استفاده شد.

فرمانتور

برای انجام آزمایشها از فرمانتور ۲ لیتری Bioflo 3000 ساخت شرکت NEW BRUNSWICK مجهز به کنترل دما، pH، دور همزن، آنتی فوم و DO استفاده شد. مقدار DO مورد نظر از طریق برقراری رابطه منطقی بین سرعت هم زدن و اختلاط گازهای هوا و اکسیژن تنظیم می شد. فرایند تخمیر در دمای 30°C ، pH ۶/۹، همزدن با دامنه ۵۰۰ تا ۹۰۰ دور بر دقیقه و DO معادل ۴۰٪ غلظت اشباع اکسیژن انجام شد (۱۳).

آنالیزها

میزان رشد باکتری در ساعتهای مختلف کشت با استفاده از اندازه گیری دانسیته نوری نمونه های فرمانتور 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 (۸) از کشتهای القا شده

استخراج و غلظت آن با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون C4 اندازه گیری شد. در این روش از شیب غلظتی آب و استونیتریل حاوی ۰.۱٪ TFA به عنوان فاز متحرک استفاده شد (۱۰).

بهینه سازی

روش آماری تاگوچی (۱۴) که کسری از فاکتوریل کامل است برای بهینه سازی چهار متغیر در سه سطح با استفاده از یک آرایه متعامد L9 استفاده شد. جدول ۱ متغیرها و سطوح مورد نظر برای انجام آزمایشها و جدول ۲ آرایه متعامد L9 را نشان می دهد.

جدول ۱- سطوح متغیرهای در نظر گرفته شده برای بهینه سازی بیان و انتقال hGM-CSF در فرایند ناپیوسته با استفاده از بیوراکتور هم زن دار

سطوح متغیرها			نام متغیر
۳	۲	۱	
۴۰	۳۰	۲۰	گلیسرول (گرم بر لیتر)
۶	۳	۰	زمان القا (ساعت)
۱	۰/۵	۰/۲۵	غلظت القا کننده (میلی مولار)
۲۰۰	۱۰۰	۰	غلظت ساکاروز (میلی مولار)

جدول ۲- آرایه متعامد L9 برای بهینه سازی بیان و انتقال hGM-CSF در فرایند ناپیوسته با استفاده از بیوراکتور هم زن دار

متغیرهای مورد آمایش				شماره آمایش
غلظت ساکاروز	غلظت القا کننده	زمان القا	گلیسرول	
۱	۱	۱	۱	۱
۲	۲	۲	۱	۲
۳	۳	۳	۱	۳
۳	۲	۱	۲	۴
۱	۳	۲	۲	۵
۲	۱	۳	۲	۶
۲	۳	۱	۳	۷
۳	۱	۲	۳	۸
۱	۲	۳	۳	۹

هر ردیف از جدول فوق نشان دهنده شرایط به کاررفته برای یک آزمایش است.

نتایج و بحث

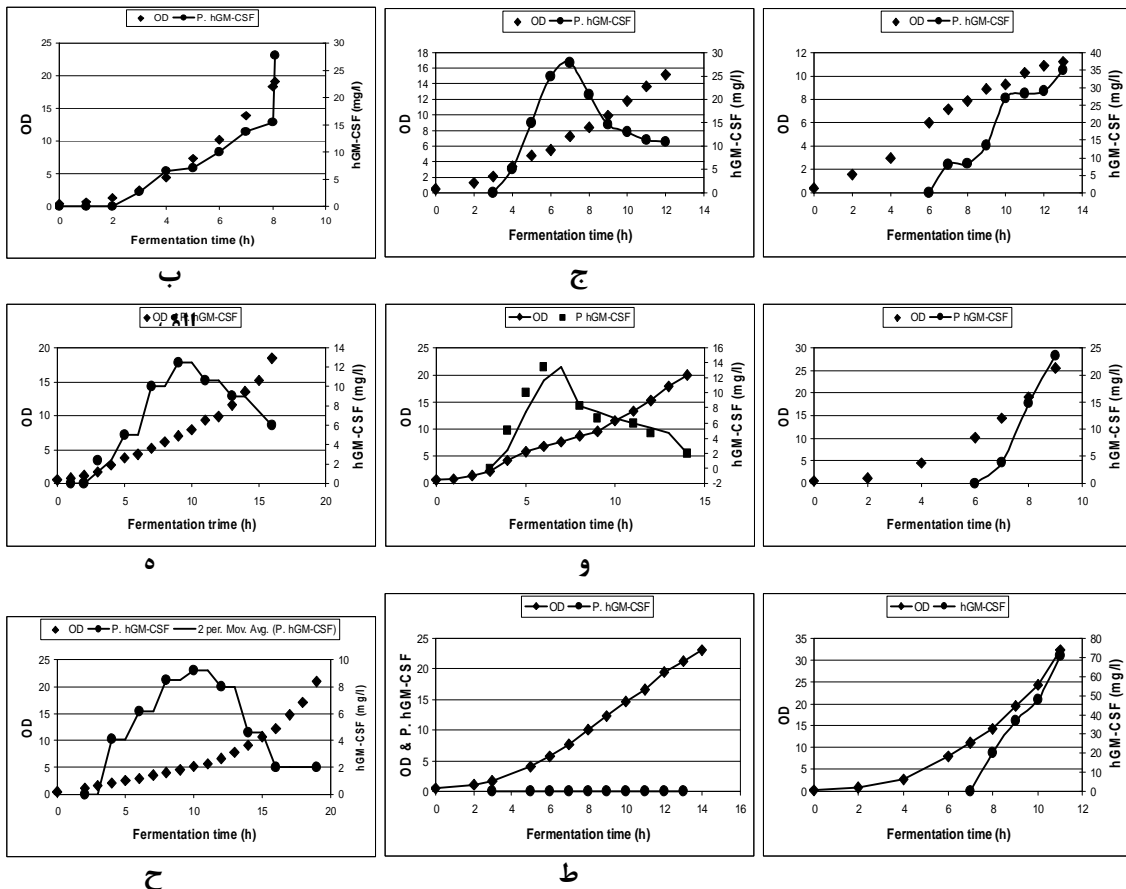
برای بررسی تاثیر متغیرهای غلظت گلیسرول (منبع کربن)، زمان القا، غلظت القا کننده و ساکاروز بر میزان بیان و انتقال GM-CSF انسانی به فضای پری پلاسمی در فرایند ناپیوسته در مجموع ۹ آزمایش با استفاده از طرح تاگوچی انجام شد. نمودارهای ۱-الف تا ۱-ط بر اساس نتایج حاصل از بررسی رشد و اندازه گیری غلظت GM-CSF انسانی در پری پلاسم بدست آمده است.

تعیین تاثیر کلی هر یک از متغیرهای مورد بررسی در بهینه سازی فرآیند تولید hGM-CSF

نمودارهای فوق نشان می دهد که بر مبنای طراحی هر آزمایش (جدول ۲) میزان تولید GM-CSF پری پلاسمی متفاوت بوده و به صورت تابعی از زمان تغییر می کند. به عبارت دیگر مقدار بیشینه تولید در ساعتهای مختلفی از آزمایشهای ۹ گانه حاصل شده است. بنابراین برای تعیین تاثیر کلی هر یک از متغیرها به صورت زیر عمل شد.

الف) تعیین معادله تجربی تولید GM-CSF انسانی با استفاده از برازش داده های هر آزمایش

ب) محاسبه تاثیر کلی هر متغیر با استفاده از میانگین نتایج مدلهای بدست آمده مربوط به آزمایشهای هم وضعیت



شکل ۱- نمودار رشد اشربیشیاکلی نو ترکیب و تولید GM-CSF پری پلاسمی در بیوراکتور ناپیوسته با شرایط آزمایش های شماره ۱ تا ۹ (الف تا ط) بهینه سازی

الف) تعیین معادله تجربی برای هر آزمایش

برای برازش داده های تجربی مربوط به تولید GM-CSF انسانی در آزمایشهای مختلف نرم افزار EXCELL مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که اغلب داده ها در چند جمله ایهای با مرتبه ۵ و بالاتر برازش می شوند (معادلات ۱ تا ۹). چون در آزمایش شماره ۸ محصولی بدست نیامد، بنابراین معادله ای نیز حاصل نشد.

$$T1 = 0.0051x^5 - 0.0809 x^4 + 0.3263 x^3 + 0.4593 x^2 - 2.1329 x + 1.31335 \quad (۱)$$

$$T2 = -0.002x^6 + 0.0232x^5 + 0.2952 x^4 - 5.619 x^3 + 28.127 x^2 - 46.672 x + 29.069 \quad (۲)$$

$$T3 = -0.2155 x^2 + 6.6202 x - 0.8571 \quad (۳)$$

$$T4 = -0.0001x^6 + 0.006 x^5 - 0.1196 x^4 + 1.0959x^3 - 4.6214 x^2 + 9.1314 x - 5.7741 \quad (۴)$$

$$T5 = 0.0025x^6 - 0.0868x^5 + 1.1424 x^4 - 7.0242 x^3 + 19.58 x^2 - 19.005x + 10.363 \quad (۵)$$

$$T6 = 9.8x - 5.5667$$

(۶)

$$T7 = -0.0002 x^6 + 0.0106 x^5 - 0.1968 x^4 + 1.7453x^3 - 7.697x^2 + 16.852x - 10.723 \quad (۷)$$

$$T8 = 0$$

(۸)

$$T9 = 14.438 \exp(0.4061x)$$

(۹)

ب) محاسبه تاثیر کلی هر متغیر با استفاده از میانگین نتایج مدل های بدست آمده مربوط به آزمایش های هم وضعیت

برای تعیین تاثیرات کلی، نتیجه آزمایش های با سطح یکسان از یک متغیر متوسط گیری و داده های حاصل بر اساس تابعی از زمان رسم شد. معادلات ۱۰ تا ۱۲ مربوط به تاثیر کلی غلظت گلیسرول (YGc1-YGc3)، معادلات ۱۳ تا ۱۵ مربوط به تاثیر کلی زمان القا (YIt1-YIt3) و معادلات ۱۶ تا ۱۸ و ۱۹ تا ۲۱ نیز به ترتیب مربوط به تاثیر غلظت القا کننده (YIc1-YIc3) و غلظت ساکاروز (YSc1-YSc3) در سطوح مختلف می باشند.

$$YGc1 = 1 / 3 (T1 + T2 + T3) \quad (۱۰)$$

$$YGc2 = 1 / 3 (T4 + T5 + T6) \quad (۱۱)$$

$$YGc3 = 1 / 3 (T7 + T8 + T9) \quad (۱۲)$$

$$YIt1 = 1 / 3 (T1 + T4 + T7) \quad (۱۳)$$

$$YIt2 = 1 / 3 (T2 + T5 + T8) \quad (۱۴)$$

$$YIt3 = 1 / 3 (T3 + T6 + T9) \quad (۱۵)$$

$$YIc1 = 1 / 3 (T1 + T6 + T8) \quad (۱۶)$$

$$YIc2 = 1 / 3 (T2 + T4 + T9) \quad (۱۷)$$

$$YIc3 = 1 / 3 (T3 + T5 + T7) \quad (۱۸)$$

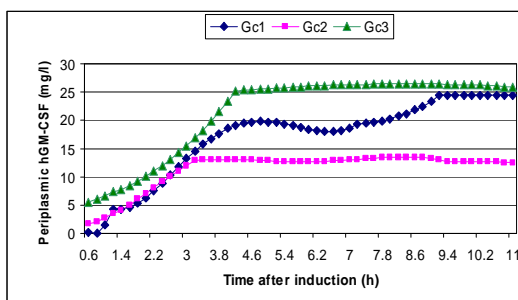
$$YSc1 = 1 / 3 (T1 + T5 + T9) \quad (۱۹)$$

$$YSc2 = 1 / 3 (T2 + T6 + T7) \quad (۲۰)$$

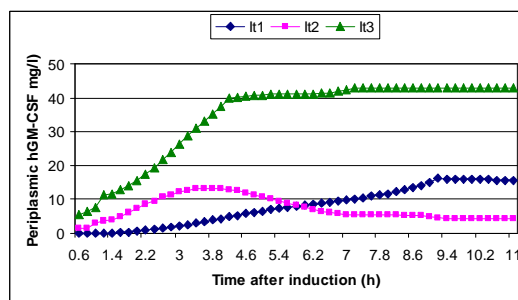
$$Y_{Sc3} = 1/3 (T3 + T4 + T8)$$

(۲۱)

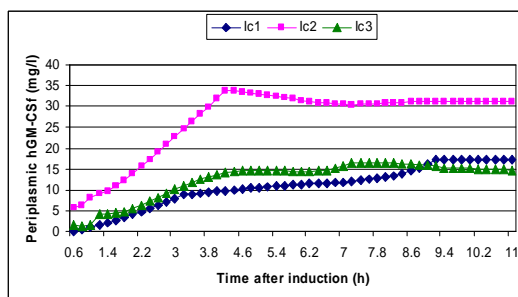
رسم هر یک از معادلات حاصله (۱۰ تا ۲۱) رفتار متغیر مورد نظر در سطح اشاره شده را نشان می دهد. همانطور که در شکل ۲-الف ملاحظه می شود غلظت ۴۰ گرم در لیتر گلیسرول سطح مناسبتری از منبع کربن نسبت به غلظتهای ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر می باشد و لذا به عنوان نقطه بهینه در نظر گرفته شده است. آزمایشها نشان می دهند که غلظت ۴۰ گرم در لیتر گلیسرول برای باکتری اشیریشیاکلی نو ترکیب مولد GM-CSF انسانی مهار کننده نیست. شکل ۲-ب تاثیر زمان القا بر میزان تولید hGM-CSF پری پلاسمی است و القا در زمانهای بالاتر را پیشنهاد می کند.



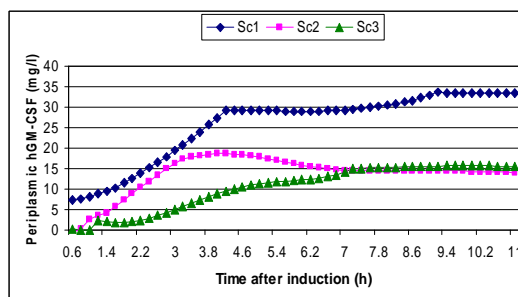
(الف)



(ب)



(ج)



(د)

شکل ۲- تاثیر کلی متغیرهای گلیسرول در سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر (الف)، زمان القا در سطوح ۰، ۳ و ۶ ساعت پس از شروع تخمیر (ب)، غلظت القا کننده IPTG در سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی مولار (ج) و غلظت ساکاروز در سطوح ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار (د) بر تولید GM-CSF پری پلاسمی در مجموعه آزمایشهای بهینه سازی در بیوراکتور ناپیوسته

القا در زمانهای پایین تر سبب جذب انرژی سلول و ممانعت از رشد آن می شود. تاثیرات کلی غلظت القا کننده در سطوح مختلف نشان می دهد که القا با استفاده از غلظت نهائی ۰/۵ میلی مولار سبب تولید حداکثر GM-CSF پری پلاسمی می شود. کاهش تولید GM-CSF در غلظتهای بالاتر IPTG را می توان به سمیت آن ربط داد. نتایج حاصل از بررسی رفتار تاثیر غلظت ساکاروز نیز، سطح صفر یعنی حالتی بدون ساکاروز را

به عنوان نقطه بهینه معرفی نمود. این امر ناشی از خروج پروتئین از سلول و تغییر شکل آن در اثر وجود ساکاروز بود (۱۰). بررسی نتایج نشان داد که سطوح بهینه متغیرها معادل شرایط آزمایش شماره ۹ می باشد.

نتیجه گیری

در شرایط بهینه یعنی غلظت ۴۰ گرم در لیتر گلیسرول و القا در ساعت ششم با غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG بدون حضور ساکاروز ۷۱ میلی گرم GM-CSF به ازای یک لیتر محیط کشت در مدت ۱۱ ساعت حاصل شد.

تشکر و قدردانی

از آقای مهدی دشتبان برای همکاری در انجام آزمایشها تشکر می کنیم.

منابع و مراجع

1. Seetharam, R. and Sharma, S.K. "Purification and Analysis of Recombinant proteins", First Edition, Marcell Dekker, New York, USA, p.170 (1991).
2. 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).
3. Makrides S. C., "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli", Microbiol. Rev., 60(3), p. 512-538 (1996).
4. Burgess A.W., Begley C. G., Johnson G. R., Lopez A. F., Williamson D. J., Mermod J. J. Simpson R. J., Schmittz A. and Delemarter J. F. "Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor", Blood 69, p. 43-51 (1987).
۵. قنبریان حسین، " بررسی بیان پری پلاسمی GM-CSF انسانی نو ترکیب تحت القا حرارتی در باکتری اشیریشیا کلی"، پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، (۱۳۸۱).
۶. شاه علی مریم، "کلونینگ و بیان ترشحی عامل تحریک کننده رده گرانولوسیت-ماکروفاژ انسانی نو ترکیب در اشیریشیاکلی"، پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، (۱۳۸۱).
7. 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).

8. 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).
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 اشیریشیا کلی نو ترکیب"، سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مجموعه مقالات، جلد سوم، صفحات ۳۲۳-۳۲۵ (۱۳۸۲).
۱۰. فاطمی س. ص.، "تولید ترشحي GM-CSF انسانی در فرایند کشت با تراکم سلولی بالای اشیریشیا کلی نو ترکیب"، رساله دکتری، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، (۱۳۸۲).
11. Kilikian B.V., Suarez I. D., Liria C. W. And Gombert A. K., "Process strategies to improve heterologous protein production in Escherichia coli under lactose or IPTG induction", Proc. Biochem., 35, p. 1019-1025 (2000).
12. Kiprianov S. M., Moldenhauer G. and Little M., "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures", J. Immunol. Meth., 200, p. 69-77 (1997).
13. 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).
14. Roy R. K., "A primer on the taguchi method", Van Nostrand Reingold, New York, (1990)