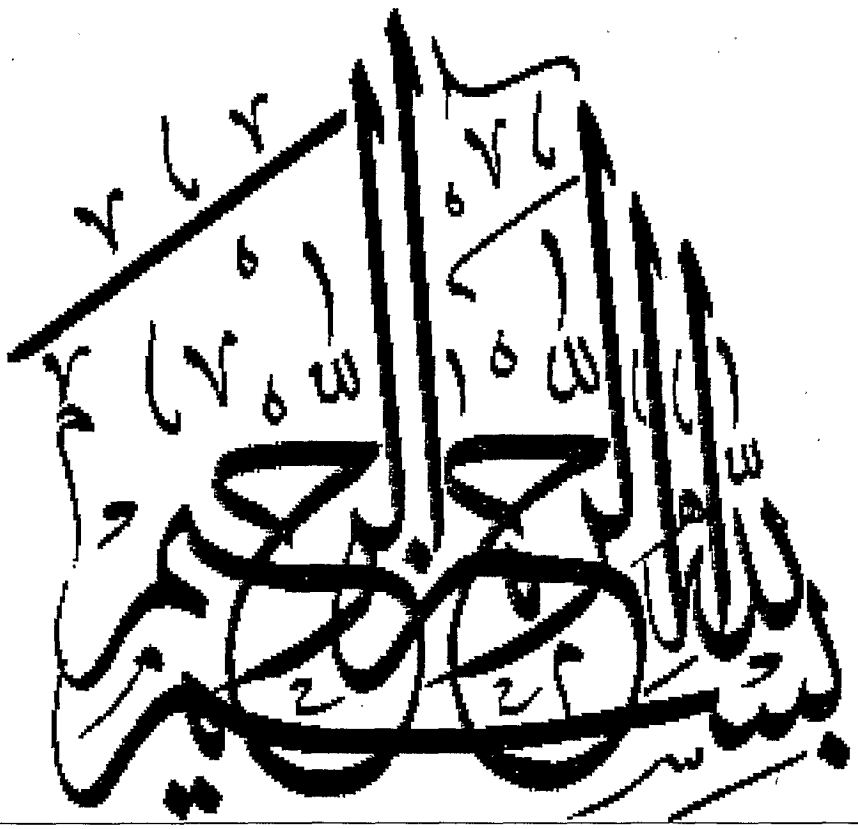

٩٣٢٥٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده فنی و مهندسی

رساله دکتری مهندسی شیمی– بیوتکنولوژی

افزایش تولید اینترفرون گامای انسانی از *اشریشیاکلی* نوترکیب در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی

ولی الله بابایی پور

استاد راهنما

دکتر سید عباس شجاع الساداتی

اساتید مشاور

دکتر نادر مقصودی– دکتر رسول خلیل زاده

۱۳۸۶/۹/۳

زمستان ۱۳۸۵

۹۳۲۵۴

تقدیم به :

پیشگاه او که جهان در انتظار عدالت اوست.

و

پدر و مادر بزگوارم که کلمات قادر به وصف شان نیستند.

و

همسر مهربانم و پسر عزیزم حسین که مشکلات این سالها را با صبر و شکیبایی خود بر من هموار کردند.

تشکر و قدردانی

با حمد و سپاس بیکران خالق یکتا که سعادت تحصیل علم را به من عنایت فرمود بر خود واجب می دانم از همه استادانی که با لطف و بزرگواری خود بر من منت نهاده و در طول دوران تحصیل روشنگر مسیر بوده اند نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشم. از استاد فرزانه جناب آقای دکتر سید عباس شجاع الساداتی که در طی حدود ۷ سال دوره کارشناسی ارشد و دکتری با راهنمایی‌های ارزنده شان مرا بنده خود ساخته‌اند کمال تشکر و امتنان را دارم .

از پدر و مادرم که درس صبر و پایداری را بمن آموختند، و همسرم و فرزندم که در طی این مدت با لطف و مهربانی خود مشکلات این سال ها را با صبر و ایثار خود بر من هموار کردند بسیار سپاسگزارم.

از آقایان دکتر نادر مقصودی و آقای دکتر رسول خلیل زاده جهت راهنمائی های ارزشمند شان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از آقایان دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی، دکتر باقر یخچالی و دکتر مجید صادقی زاده و سرکار خانم دکتر فرشته نعیم پور که دعوت بنده را برای شرکت در جلسه دفاع از رساله را پذیرفته و زحمت داوری کار اینجانب را قبول نمودند نیز کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همکاری‌های بیدریغ آقای مهندس احمد کریمی ریاست محترم پژوهشکده علوم و فناوری زیستی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همکاری‌های بیدریغ آقایان سید مرتضی رباط جزی، مهدی زین الدینی، علی اصغر دلدار، علی بهرامی، امیر محمد فرنود، محمدرضا معصومیان و خانم ها دکتر فاطمه تابنده، دکتر پروین شریعتی و فاطمه تیموری کمال تشکر را دارم.

از تمامی همکاران گرامی در پژوهشکده علوم و فن‌آوری زیستی که به نحوی بنده را یاری کرده‌اند سپاسگزارم.

چکیده

باکتری *اشریشیاکلی* به دلیل شناخته‌تر بودن خواص فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی آن، رایج ترین میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. توسعه موفق و اقتصادی فرآیندهای تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلی* مستلزم دستیابی به بالاترین بهره‌دهی کلی تولید پروتئین می‌باشد.

بهینه سازی محیط کشت در کشت غیرمداوم و روش خوراک دهی در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی بعنوان دو رویکرد اساسی در افزایش تولید پروتئین های نوترکیب مورد توجه هستند. در این پژوهش نیز از این دو راهکار برای افزایش تولید اینترفرون گامای انسانی استفاده شد.

در ابتدا تولید اینترفرون گاما در طی سه مرحله در کشت غیر مداوم باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی افزایش داده شد. در مرحله اول، با بررسی سه محیط کشت مختلف شامل محیط کشت ساده M۹ با غلظت ۲/۵ برابر نمک ها و حاوی عناصر کم مقدار برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب شد. با این محیط غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۱۰ ± ۵۲۰ mg/L و ۵ ± ۱۱۵ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ بدست آمد. در مرحله دوم اثر شرایط القاء (زمان القاء، نوع و مقدار القاءگر) و خوراک دهی بعد از القاء (مخلوط اسیدهای آمینه) روی تولید اینترفرون گامای انسانی در محیط کشت انتخابی مرحله اول با روش طراحی آماری آزمایش های تاگوچی بررسی شد و شرایط بهینه : القا در تراکم سلولی۲/۱۵ گرم بر لیتر وزن خشک، مقدار IPTG ۰/۲ mmol/L (ایزو پروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزاید[1])و ۲ mmol /L لاکتوز به عنوان القاگر، و افزودن مخلوط اسیدهای آمینه (برحسب میلی گرم اسید آمینه بر گرم وزن خشک توده زیستی) شامل: گلوتامیک اسید ۴۳، آسپارتیک اسید ۵۰، لیزین ۳۲و فنیل آلانین ۱۸، غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما افزایش یافت و به ترتیب به ۰/۱ ± ۲ g/L و ۵ ± ۱۹۰ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ رسید. در ادامه با بررسی اثر غلظت گلوکز تحت شرایط بهینه بدست آمده، غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۰/۱ ± ۴/۲ g/L و ۱۰ ± ۴۳۰ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ افزایش داده شد. این مقادیر بالاترین مقدار تولید و بهره دهی کلی است که تاکنون برای تولید پروتئین نوترکیب در کشت غیرمداوم گزارش شده است.

سپس روش خوراک دهی با «سرعت رشد ویژه بیشینه قابل دسترس» برای رسیدن به تراکم سلولی بالا در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی بررسی شد و مناسب ترین منحنی تغییرات سرعت خوراک دهی برای رسیدن به بالاترین مقدار تولید و بهره دهی کلی توده زیستی و تولید اینترفرون گاما توسعه داده شد. با این روش در حالت بدون القاء در مدت ۱۷ ساعت تراکم سلولی ۱۴۵ گرم برلیتر وزن خشک بدست آمد. در حالیکه پایداری پلاسمید تا پایان فرایند بالاتر از ۹۵٪ قرار داشته و غلظت متابولیت های جانبی(مثل استات و لاکتات) پایین تر از سطح بازدارندگی و غلظت اجزا اصلی محیط در محدوده مجاز خود قرار داشتند. با القا در تراکم سلولی ۶۵ گرم بر لیتر وزن خشک، بیشینه تراکم سلولی و غلظت اینترفرون گاما ۱۷ ساعت بعد از شروع فرایند تخمیر به ترتیب ۱۱۵

[1] Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

گرم بر لیتر وزن خشک و ٤٢ گرم بر لیتر بدست آمد که بیش از دو برابر بالاترین مقدار گزارش شده است. همچنین بالاترین بازدهی ویژه و بهره دهی کلی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۳۷۰ میلی گرم اینترفرون گاما بر گرم وزن خشک سلول و ۲/۵۸ گرم اینترفرون گاما بر لیتر بر ساعت بدست آمد. که بالاترین مقدار بازدهی و بهره دهی است که تاکنون برای تولید پروتئین های نوترکیب گزارش شده است.

در ادامه برای افزایش بیشتر تولید، شرایط القا شامل زمان القا، مقدار القاگر و مدت زمان بعد از القا با روش آماری یک فاکتور در یک زمان در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی بهینه سازی شد و زمان القا در تراکم سلولی ٦٥ گرم بر لیتر، مقدار القاگر (IPTG) $mg\ L^{-1}g^{-1}(DCW)$ ۲/۲۵ و مدت ٤ ساعت بعد القا به عنوان شرایط بهینه القا انتخاب شد. در این شرایط تراکم نهایی سلول از ۱۱۲ به ۱۲۷ گرم بر لیتر وزن خشک و غلظت اینترفرون گاما از ٤٢ به ٥١ گرم بر لیتر و بهره دهی کلی تولید اینترفرون گاما از ۲/۵۸ به $g\ L^{-1}h^{-1}$ ۳ افزایش یافت.

برای بررسی بیشتر راهبرد خوراک دهی توسعه داده شده، اثر تراکم سلولی بالا در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی روی پاسخ سلولی بررسی شد. مشخص شد که ۱) در تراکم سلولی بالا، مورفولوژی سلول ها تغییر کرده و از حالت میله ای به سلول های کروی تغییر شکل یافته اند، ۲) تراکم سلولی بالا در سامانه غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه *اشریشیاکلی* مولد اینترفرون گاما تاثیر چندانی روی لیز سلولی ندارد، ۳) در کشت غیرمداوم مقدار cAMP خارج سلولی با کاهش تدریجی گلوکز در دسترس به تدریج افزایش می یابد تا نهایتا به ۲۰μM می رسد. ولی در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی غلظت cAMP[2] خارج سلولی به علت شرایط کمبود گلوکز و فعالیت بالای سامانه فسفوترانسفراز در زمان القا به ۱۰۰ μM می رسد، ٤) در سامانه کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی از زمان القا تا انتهای فرایند مقدار پلاسمید تقریبا ثابت باقی می ماند.

واژه‌های کلیدی: اینترفرون گامای انسانی، کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی، روش خوراک دهی، اشریشیاکلی نوترکیب، سرعت رشد ویژه، پاسخ سلولی، کشت با تراکم سلولی بالا

[2] Cyclic Adenosine mono-phosphate

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
۱- کلیات و مروری بر پژوهش های انجام شده	٦
۱-۱- اینترفرون گاما	۷
۱-۱-۱- مقدمه ای بر انواع اینترفرون‌ها	۷
۱-۱-۲- ویژگی های فیزیکوشیمیایی اینترفرون گاما	
۱-۱-۳- ویژگی های عملکردی اینترفرون گاما	۱۱
۱-۱-٤- کاربردهای داروئی اینترفرون-گاما	۱۲
۱-۱-٥- سابقه تولید اینترفرون-گامای نوترکیب در جهان	۱۲
۱-۲- راهبردهای افزایش تولید پروتئین های نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلی*	۱٤
۱-۲-۱- راهبردهای مهندسی ژنتیک در افزایش بیان پروتئین های نوترکیب	۱٥
۱-۲-۲- کاربردهای مهندسی سوخت و ساز در بهینه سازی باکتری *اشریشیاکلی*	۱۸
۱-۲-۳- نقش مهندسی فرایند در بهینه سازی کشت *اشریشاکلی* نوترکیب	۲۳
۱-۲-۳-۱- مزایا و معایب کشت با تراکم سلولی بالا	۲۳
۱-۲-۳-۲- راهکارهای مهندسی فرایند برای کاهش معایب کشت با تراکم سلولی بالا	۲٤
۱-۲-۳-۲-۱- اجرای روش های مختلف خوراک دهی	۲٤
۱-۲-۳-۲-۲- بهینه سازی محیط کشت و زمان القاء	۲۷
۱-۲-۳-۲-۳- مدل سازی و کنترل فرایند خوراک دهی	۳۰
۱-۲-۳-۲-٤- بهبود شرایط هیدرودینامیک	۳۱
۱-۳- طراحی آماری آزمایش‌ها	۳٥
۱-۳- ۱- طراحی و هدایت آزمایش ها	۳٦
۱-۳-۲- تجزیه و تحلیل نتایج	۳۸
۱-٤- مروری بر پژوهش های انجام شده برای تولید پروتئین های نوترکیب در کشور	٤۰
۱-٥- نتیجه پژوهش های گذشته	٤۱
۱-٦- ضرورت تحقیق	٤۳
۲- مواد و روشها	٤٤
۲-۱- میزبان و پلاسمید	٤٥

عنوان	صفحه
۲-۲- محیط کشت	٤٦
۲-۳- تهیه سویه نوترکیب	٤٧
۲-٤- تهیه کلکسیون میکروبی و نگهداری آنها	٤٩
۲-٥- آزمایش بررسی عدم آلودگی کلکسیون میکروبی	٥٠
۲-٦- آزمایش یکنواختی کلکسیون میکروبی	٥٠
۲-۷- اندازه گیری تعداد سلولهای زنده	٥٠
۲-۸- تعیین پایداری پلاسمید	٥١
۲-۹- تعیین یکنواختی میزان بیان	٥٢
۲-۱۰- کشت غیر مداوم	٥٣
۲-۱۱- کشت غیر مداوم همراه با خوراکدهی	٥٣
۲-۱۲- سنجش میزان بیان	٥٦
۲-۱۳- سنجش گلوکز	٥٩
۲-۱٤- سنجش آمونیم	٦٠
۲-۱٥- سنجش استات	٦١
۲-۱٦- سنجش لاکتات	٦٣
۲-۱۷- سنجش فسفات	٦٤
۲-۱۸- سنجش توده سلولی	٦٥
۲-۱۸-۱- اندازه‌گیری دانسیته نوری (OD) سوسپانسیون میکروبی	٦٥
۲-۱۸-۲- سنجش توده سلولی	٦٥
۲-۱۹- اندازه گیری پروتئین کل(روش برادفورد)	٦٦
۲-۲۰- شمارش تعداد سلولها	٦٧
۲-۲۱- تکثیر DNA نوترکیب	٦٧
۲-۲۲- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت آنزیمی	٦٨
۲-۲۳- سنجش cAMP	٦٨
۲-۲٤- بررسی تغییرات مورفولوژیکی	٦٩
۲-۲٥- تعیین عوامل سینتیکی رشد سلول و تولید پروتئین	۷۰
۲-۲٦- بهینه سازی شرایط القاء در کشت غیرمداوم *اشریشیاکلی* نوترکیب	۷۱

عنوان	صفحه
۲-۲۷- دستیابی به خوراک دهی جدید درکشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی	۷۳
۳- نتایج و بحث	۷٤
۳-۱- افزایش تولید در کشت غیر مداوم	۷۵
۳-۱-۱- انتخاب محیط کشت ساده	۷۵
۳-۱-۲- بهینه سازی شرایط تولید در محیط کشت ساده انتخابی	۷۹
۳-۱-۳- افزایش تولید در کشت ساده	۸۵
۳-۲- کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی	۸۹
۳-۲-۱- توسعه یک راهکار جدید خوراکدهی	۹۰
۳-۲-۲- بهینه سازی شرایط القاء در کشت غیرمداوم با راهکار خوراکدهی جدید	۹۹
۳-۲-۲-۱- اثر مقدار القاگر روی رشد سلول و تولید اینترفرون گاما	۱۰۰
۳-۲-۲-۲- اثر زمان القا روی رشد سلول و تولید اینترفرون گاما	۱۰٤
۳-۲-۲-۳- اثر مدت زمان بعد القا روی رشد سلول و تولید اینترفرون گاما	۱۰٦
۳-۲-۲-٤- سینتیک رشد سلول و تولید اینترفرون گاما تحت شرایط بهینه القا	۱۰۷
۳-۲-۳- بررسی اثر خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه (قابل دسترس) بر خصوصیات مختلف باکتری اشریشاکلی نوترکیب	۱۱۰
۳-۲-۳-۱- اثر تراکم سلولی بالا بر شکل سلول	۱۱۰
۳-۲-۳-۲- اثر تراکم سلولی بالا بر لیز سلول	۱۱۲
۳-۲-۳-۳- اثر تراکم سلولی بالا بر cAMP خارج سلولی	۱۱۲
۳-۲-۳-٤- اثر تراکم سلولی بالا بر مقدار پلاسمید	۱۱٤
۳-۳- نتیجه گیری کلی	۱۱۵
۳-٤- نوآوری‌های تحقیق	۱۱۷
۳-۵- پیشنهادها	۱۱۸
مراجع	۱۲۱
پیوست	۱۳۷
واژه نامه انگلیسی به فارسی	۱٤٤
واژه نامه فارسی به انگلیسی	۱٤۹

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل۱-۱- توالی اسیدهای‌آمینه مولکول اینترفرون –گامای انسانی	۹
شکل ۱-۲- سه روش ممکن در طراحی آزمایش	۳۷
شکل۱-۳- نمودار آثار اصلی برای تعیین درجه اثر متقابل بین دو عامل	٤۰
شکل۲-۱- ساختمان و نحوه عمل پلاسمیدهای گروه pET در سویه‌های(*E. coli* BL21 (DE3	٤٥
شکل۲-۲- ساختمان پلاسمید pET3a-*hifnγ*. ژن اینترفرون-گامای انسانی	٤٦
شکل۲-۳- نمودارخوراک‌دهی نمایی بر حسب شدت حجمی ورود خوراک (میلی‌لیتر بر دقیقه) با استفاده از معادله خوراک‌دهی با سرعت رشد ثابت	٥٥
شکل ۳-۱- اثر ترکیب محیط کشت بر سرعت رشد ویژه (h^{-1}) و وزن خشک سلول (g/L) در کشت غیر مداوم [pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٧٦
شکل ۳-۲- اثر ترکیب محیط کشت بر غلظت گلوکز باقیمانده (g/L) در کشت غیر مداوم *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*]	٧٧
شکل ۳-۳- اثر ترکیب محیط کشت بر اینترفرون گامای تولید شده (mg/L) و بازدهی تولید اینترفرون گاما (mg/L) در کشت غیر مداوم[pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٧٨
شکل۳-٤- میانگین اثر عوامل مختلف روی بهره دهی کلی تولید پروتئین نوترکیب	٨١
شکل۳-٥- ژل SDS-PAGE حاصل از بیان اینترفرون گامای نوترکیب در شرایط بهینه تخمیر	٨٢
شکل۳-٦- اثرغنی سازی محیط کشت در زمان القاء با اسیدهای آمینه روی تراکم سلولی و تغییرات سرعت رشد ویژه در کشت غیر مداوم [pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٨٣
شکل۳-۷- اثرغنی سازی محیط کشت با اسیدهای آمینه در زمان القاء روی تولید و بازدهی اینترفرون گاما در کشت غیر مداوم [pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٨٤
شکل۳-۸- اثرمقدار اولیه گلوکز محیط کشت بر تراکم سلولی و تغییرات سرعت رشد ویژه در کشت غیر مداوم pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٨٦
شکل۳-۹- اثر مقدار اولیه گلوکز محیط کشت روی تغییرات غلظت گلوکز در کشت غیر مداوم[pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٨٧
شکل۳-۱۰- اثرمقدار اولیه گلوکز محیط کشت روی غلظت و بازدهی اینترفرون گاما در کشت غیر مداوم [pET3a-*ifnγ*] *E. coli* BL21 (DE3)	٨٨
شکل ۳-۱۱- اثر راهبرد خوراک دهی جدید در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*] بدون القاء	٩٢
شکل ۳-۱۲- اثر راهبرد خوراک دهی جدید در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*] با القاء	٩٤

عنوان	صفحه
شکل ۳-۱۳- اثر راهبرد خوراک دهی جدید در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*] با القاء روی بازدهی تولید توده زیستی به گلوکز مصرفی ($Y_{x/s}$) (گرم وزن خشک سلول بر گرم گلوکز مصرفی) و بازدهی تولید توده زیستی به آمونیم مصرفی($Y_{x/NH4^+}$) (گرم وزن خشک سلول بر گرم آمونیم مصرفی).	۹۵
شکل۳-۱٤- ژل SDS-PAGE حاصل از بیان پروتئین نوترکیب در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه (قابل دسترس) *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*].	۹۶
شکل ۳-۱۵- اثر مقدار القاگر (mg IPTG L^{-1} g^{-1}DCW) روی تراکم سلولی نهایی (g DCW /L) و بهره دهی کلی تولید توده زیستی(g DCW $L^{-1}h^{-1}$) در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۱۰۱
شکل ۳-۱٦- اثر مقدار القاگر (mg IPTG L^{-1} g^{-1} DCW) روی تولید نهایی اینترفرون گاما (g/L rhIFN-γ) و بهره دهی کلی تولید اینترفرون گاما (g $L^{-1}h^{-1}$ rhIFN-γ) در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۱۰۲
شکل ۳-۱۷- تغییرات زمانی: (الف) سرعت رشد ویژه(μ)، (ب) سرعت تولید rhIFN-γ (q_p) در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*].	۱۰۳
شکل ۳-۱۸- تغییرات زمانی سرعت تولید rhIFN-γ نسبت به مقدار القاگر در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*].	۱۰٤
شکل ۳-۱۹- اثر زمان القا (تراکم سلولی در زمان القا (g DCW/ L) روی تراکم سلولی نهایی (g DCW/L) و بهره دهی تولید توده زیستی(g DCW L^{-1} h^{-1}) در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*].	۱۰۵
شکل ۳-۲۰- اثر زمان القا (تراکم سلولی در زمان القا (g DCW/L) روی غلظت نهایی اینترفرون گاما(g rhIFN-γ/ L) و بهره دهی تولیداینترفرون گاما(g L^{-1} h^{-1} rhIFN-γ) در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۱۰٦
شکل ۳-۲۱ -سینتیک رشد *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*] در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی تحت شرایط بهینه القا.	۱۰۸
شکل ۳-۲۲- سینتیک تولید اینترفرون گاما در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*] تحت شرایط بهینه القا	۱۰۸
شکل ۳-۲۳- غلظت اجزاء اصلی محیط کشت (g/L) در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*] تحت شرایط بهینه القا	۱۰۹

عنوان	صفحه
شکل ۳-۲٤- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*] پس از القا بیان اینترفرون گاما در پایان کشت و غیرمداوم همراه با خوراک دهی	۱۱۱
شکل۳-۲۵- نمودار تغییرات غلظت cAMP در کشت غیر مداوم و غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۱۱۳
شکل ۳-۲٦- نمودار تغییرات مقدار پلاسمید در یک گرم وزن خشک و غلظت پلاسمید بر حسب زمان در کشت غیرمداوم و کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی	۱۱٤

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول۱-۱- نقش بیولوژیک اینترفرون ها	۸
جدول۱-۱- درصد فراوانی اسیدهای آمینه در اینترفرون-گامای انسانی	۱۰
جدول ۱-۳- عوامل موثر بر ناپایداری پلاسمیدها و راه کارهای غلبه برآنها	۱۶
جدول ۱-٤- مزایا و معایب تشکیل توده‌های متراکم پروتئینی در *اشریشیاکلی*	۱۸
جدول ۱-٥- روشهای ساده و معمول خوراک‌دهی در کشت غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی	۲٦
جدول ۱-٦- آرایهٔ متعامد L_8 (2^7)	۳۹
جدول ۱-۷- آرایه متعامد L_4	٤۰
جدول ۲-۱- ترکیب شیمیایی محیط کشت مشخص M۹ اصلاح شده و محلول خوراک استفاده شده در کشت غیرمداوم و غیر مداوم خوراک‌دهی شده	٤۷
جدول۲-۲- روابط کالیبراسیون پمپ برای محلول‌های خوراک گلوکز	٥٦
جدول۲-۳- طرز تهیه ژل ۱۲/٥٪ پلی اکریل آمید برای SDS-PAGE	٥۸
جدول۲-٤- عوامل و سطوح مورد مطالعه	۷۱
جدول۲-٥- آرایه های متعامدL_9	۷۲
جدول ۳-۱- نتایج آزمایشهای انجام شده بر اساس آرایه متعامدL_9	۸۰
جدول ۳-۲- آنالیز واریانس نتایج آزمایشهای انجام شده بر اساس آرایه متعامدL_9	۸۰
جدول ۳-۳- شرایط بهینه تولید پروتئین نوترکیب	۸۰
جدول ۳-٤- اثر بهینه سازی شرایط تولید روی رشد سلول نوترکیب و تولید اینترفرون گاما	۸۳
جدول۳- ٥- مقایسه نتایج مقدار بهینه شده مرحله قبل با بهینه سازی نهایی در کشت غیر مداوم *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۸۹
جدول ۳-٦- خلاصه نتایج کشت غیرمداوم خوراک دهی شده با سرعت رشد ویژه بیشینه (قابل دسترس) باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب سویه [pET3a-*hifnγ*]BL21(DE3) با استفاده از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی	۹۷
جدول ۳-۷- مقایسه نتایج کشت غیرمداوم در محیط کشت پیچیده LB ، کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شده با سرعت رشد ویژه ثابت و متغیر و سرعت ریژه حداکثر برای باکتری *اشریشیا کلی* سویه [pET3a-*hifnγ*]BL21(DE3) با استفاده از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی.	۹۸
جدول۳- ۸- عوامل و سطوح مورد مطالعه برای بهینه سازی شرایط القاء کشت غیرمداوم خوراک دهی شده با سرعت رشد ویژه بیشینه *E. coli* BL21(DE3) [pET3a-*ifnγ*]	۱۰۰

عنوان	صفحه

جدول ۳-۹- مقایسه نتایج کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی *E. coli* BL21 (DE3) [pET3a-*ifnγ*] تحت شرایط بهینه القا mg IPTG $L^{-1}g^{-1}$DCW ۲/۲۵ و تراکم سلولی ٦٥g DCW /L در زمان القا و ٤ ساعت بعد القا) و شرایط بهینه تحت شرایط قبل از بهینه: القا با mg IPTG $L^{-1}g^{-1}$ DCW ۱۱ و تراکم سلولی g DCW /L ٦٥ در زمان القا و ۳ ساعت بعد القا). ۱۱۰

مقدمه

چکیده

باکتری *اشریشیاکلی* به دلیل شناخته‌تر بودن خواص فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی آن، رایج ترین میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. توسعه موفق و اقتصادی فرآیندهای تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *اشریشیاکلی* مستلزم دستیابی به بالاترین بهره‌دهی کلی تولید پروتئین می‌باشد.

بهینه سازی محیط کشت در کشت غیرمداوم و روش خوراک دهی در کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی بعنوان دو رویکرد اساسی در افزایش تولید پروتئین های نوترکیب مورد توجه هستند. در این پژوهش نیز از این دو راهکار برای افزایش تولید اینترفرون گامای انسانی استفاده شد.

در ابتدا تولید اینترفرون گاما در طی سه مرحله در کشت غیر مداوم باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی افزایش داده شد. در مرحله اول، با بررسی سه محیط کشت مختلف شامل محیط کشت ساده M۹ با غلظت ۲/۵ برابر نمک ها و حاوی عناصر کم مقدار برای تولید پروتئین نوترکیب انتخاب شد. با این محیط غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۱۰ ± ۵۲۰ mg/L و ۵ ± ۱۱۵ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ بدست آمد. در مرحله دوم اثر شرایط القاء (زمان القاء، نوع و مقدار القاءگر) و خوراک دهی بعد از القاء (مخلوط اسیدهای آمینه) روی تولید اینترفرون گامای انسانی در محیط کشت انتخابی مرحله اول با روش طراحی آماری آزمایش های تاگوچی بررسی شد و شرایط بهینه : القا در تراکم سلولی۲/۱۵ گرم بر لیتر وزن خشک، مقدار ۰/۲ mmol/L IPTG (ایزو پروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزاید[1])و ۲ mmol /L لاکتوز به عنوان القاگر، و افزودن مخلوط اسیدهای آمینه (برحسب میلی گرم اسید آمینه بر گرم وزن خشک توده زیستی) شامل: گلوتامیک اسید ۴۳، آسپارتیک اسید ۵۰، لیزین ۳۲و فنیل آلانین ۱۸، غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما افزایش یافت و به ترتیب به ۰/۱ ± ۲ g/L و ۵ ± ۱۹۰ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ رسید. در ادامه با بررسی اثر غلظت گلوکز تحت شرایط بهینه بدست آمده، غلظت و بهره دهی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۰/۱ g/L ± ۴/۲ و ۱۰ ± ۴۳۰ $mg\ L^{-1}h^{-1}$ افزایش داده شد. این مقادیر بالاترین مقدار تولید و بهره دهی کلی است که تاکنون برای تولید پروتئین نوترکیب در کشت غیرمداوم گزارش شده است.

سپس روش خوراک دهی با «سرعت رشد ویژه بیشینه قابل دسترس» برای رسیدن به تراکم سلولی بالا در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی بررسی شد و مناسب ترین منحنی تغییرات سرعت خوراک دهی برای رسیدن به بالاترین مقدار تولید و بهره دهی کلی توده زیستی و تولید اینترفرون گاما توسعه داده شد. با این روش در حالت بدون القاء در مدت ۱۷ ساعت تراکم سلولی ۱۴۵ گرم برلیتر وزن خشک بدست آمد. در حالیکه پایداری پلاسمید تا پایان فرایند بالاتر از ۹۵٪ قرار داشته و غلظت متابولیت های جانبی(مثل استات و لاکتات) پایین تر از سطح بازدارندگی و غلظت اجزا اصلی محیط در محدوده مجاز خود قرار داشتند. با القا در تراکم سلولی ۶۵ گرم بر لیتر وزن خشک، بیشینه تراکم سلولی و غلظت اینترفرون گاما ۱۷ ساعت بعد از شروع فرایند تخمیر به ترتیب ۱۱۵

[1] Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

گرم بر لیتر وزن خشک و ٤٢ گرم بر لیتر بدست آمد که بیش از دو برابر بالاترین مقدار گزارش شده است. همچنین بالاترین بازدهی ویژه و بهره دهی کلی تولید اینترفرون گاما به ترتیب ۳۷۰ میلی گرم اینترفرون گاما بر گرم وزن خشک سلول و ۲/۵۸ گرم اینترفرون گاما بر لیتر بر ساعت بدست آمد. که بالاترین مقدار بازدهی و بهره دهی است که تاکنون برای تولید پروتئین های نوترکیب گزارش شده است.

در ادامه برای افزایش بیشتر تولید، شرایط القا شامل زمان القا، مقدار القاگر و مدت زمان بعد از القا با روش آماری یک فاکتور در یک زمان در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی بهینه سازی شد و زمان القا در تراکم سلولی ٦٥ گرم بر لیتر، مقدار القاگر (IPTG) $mg\ L^{-1}g^{-1}(DCW)$ ۲/۲۵ و مدت ٤ ساعت بعد القا به عنوان شرایط بهینه القا انتخاب شد. در این شرایط تراکم نهایی سلول از ۱۱۲ به ۱۲۷ گرم بر لیتر وزن خشک و غلظت اینترفرون گاما از ٤٢ به ٥١ گرم بر لیتر و بهره دهی کلی تولید اینترفرون گاما از ۲/۵۸ به $g\ L^{-1}h^{-1}$ ۳ افزایش یافت.

برای بررسی بیشتر راهبرد خوراک دهی توسعه داده شده، اثر تراکم سلولی بالا در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه باکتری *اشریشیاکلی* نوترکیب مولد اینترفرون گامای انسانی روی پاسخ سلولی بررسی شد. مشخص شد که ۱) در تراکم سلولی بالا، مورفولوژی سلول ها تغییر کرده و از حالت میله ای به سلول های کروی تغییر شکل یافته اند، ۲) تراکم سلولی بالا در سامانه غیرمداوم همراه با خوراک دهی با سرعت رشد ویژه بیشینه *اشریشیاکلی* مولد اینترفرون گاما تاثیر چندانی روی لیز سلولی ندارد، ۳) در کشت غیرمداوم مقدار cAMP خارج سلولی با کاهش تدریجی گلوکز در دسترس به تدریج افزایش می یابد تا نهایتا به ۲۰μM می رسد. ولی در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی غلظت cAMP[2] خارج سلولی به علت شرایط کمبود گلوکز و فعالیت بالای سامانه فسفوترانسفراز در زمان القا به ۱۰۰ μM می رسد، ٤) در سامانه کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی از زمان القا تا انتهای فرایند مقدار پلاسمید تقریبا ثابت باقی می ماند.

واژه‌های کلیدی: اینترفرون گامای انسانی، کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی، روش خوراک دهی، اشریشیاکلی نوترکیب، سرعت رشد ویژه، پاسخ سلولی، کشت با تراکم سلولی بالا

[2] Cyclic Adenosine mono-phosphate

پروتئین های نوترکیب دارویی با رشد سالانه ۱۵درصدی بخش عمده ای از بازار بزرگ فرآورده های دارویی را بخود اختصاص داده است. ترکیب فناوری DNA نوترکیب و فرآیندهای کشت انبوه ارگانیسم ها امکان تولید زیاد این فراورده ها را که تولید انبوه و کم هزینه آنها از منابع طبیعی غیرممکن و یا بسیار مشکل است، مثل انواع اینترفرون ها، اینترلوکین ها، هورمون های رشد، سرم آلبومین انسانی و ....،را فراهم کرده است.

باکتری *اشریشیاکلی* یکی از رایجترین میزبان ها است که به علت تکثیر سریع، وجود سیستم‌های قابل دسترسی مناسب برای دستکاری ژنی، شناخته بودن ساختار ژنتیکی، فیزیولوژی و ساختمان سلولی و مسیرهای متابولیکی نسبت به دیگر ارگانیسم‌ها و توسعه روش های تخمیری و شرایط کشت مختلف باکتری، برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. بدین منظور محققین با بهره‌گیری از روشها و فنون مختلف تلاش‌های زیادی را در جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در *اشریشیاکلی* (بعنوان بهترین میزبان تولید فرآورده‌های نوترکیب) انجام داده‌اند تا بتوانند محصول مورد نظر را در کمترین زمان و با صرف کمترین هزینه تولید نمایند. تحقیقاتی که در این رابطه روی *اشریشیاکلی* انجام می‌شود بیشتر فراهم کردن یک راهکار مناسب برای دستیابی به کشت با تراکم سلولی بالا با قابلیت بیان بیشینه است، چرا که بدلیل انباشت درون سلولی بیشتر پروتئین‌های نوترکیب در *اشریشیاکلی*، قابلیت تولید متناسب با دانستیه سلولی نهایی است

کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی، روش انتخابی رسیدن به دانسیته سلولی بالا و به تبع آن تولید بالای پروتئین نوترکیب است. اجرای فرآیند تخمیر غیرمداوم همراه با خوراک دهی علیرغم مزایای متعدد، بدلیل مشکلاتی مثل محدودیت و یا بازدارندگی مواد خام مورد نیاز رشد باکتری، سرعت بالای تولید CO_2 و گرما، نیاز زیاد به اکسیژن و در نتیجه محدودیت ظرفیت انتقال اکسیژن، افزایش شدید ویسکوزیته و به دنبال آن کاهش کارایی اختلاط، ناپایداری پلاسمید و کاهش تولید

محصول با طولانی شدن زمان فرآیند، تخریب محصولات توسط پروتئازهای درون سلولی، انباشت متابولیت‌های جانبی تا سطح بازدارندگی، همواره با چالش‌هایی همراه بوده است. از اینرو محققین همواره در تلاش هستند که با اتخاذ راهکارهای مختلف محدودیت‌های مذکور را به حداقل برسانند.

روش خوراک دهی مواد غذایی مورد نیاز رشد برای دستیابی به دانسیته سلولی بالا حیاتی است، بطوریکه نه تنها روی حداکثر غلظت سلولی قابل دسترس بلکه همچنین روی قابلیت تولید پروتئین نوترکیب نیز موثر است. کشت با دانسیته سلولی بالا معمولاً با محدودیت یک یا چند مورد از اجزاء خوراک اجرا می‌شود، که در این رابطه بیشتر از روشهای خوراک‌دهی ساده مثل خوراک‌دهی با سرعت ثابت، خوراک‌دهی با افزایش سرعت خوراک بصورت یک تابع پله‌ای، خوراک‌دهی بر اساس تابع نمایی برای بدست آوردن دانسیته سلولی بالا در کشت‌های غیر مداوم همراه با خوراک‌دهی استفاده شده است که اجرای هریک از آنها با مشکلات و معایبی همراه است. همین امر باعث شده محققین همواره بدنبال یافتن راهکارهای ساده تر، دقیق تر با کارایی بالاتر جهت بهره برداری حداکثر از توان تولید پروتئین نوترکیب باکتری در حداقل زمان باشند.

روش معمول افزایش دانسیته سلولی و قابلیت تولید پروتئین های نوترکیب، بهینه سازی ترکیب محیط کشت، پارامترهای اساسی فرایند(pH، دما، همزدن) و شرایط القاء است. برقراری موازنه مناسب در اجزاء خوراک مثل منابع کربنی/انرژی، نیتروژنی و خصوصاً ترکیباتی مثل ویتامین‌ها، فاکتورهای رشد، عناصر کمیاب که با غلظت کم مورد نیاز هستند، تاثیر قابل توجهی در موفقیت کشت با تراکم سلولی بالای پروتئین‌های نوترکیب دارند. ترکیب محیط کشت می‌تواند محدود کننده متابولیت‌های جانبی باشد. از اینرو در فرآیند تخمیر *اشریشیاکلی* غلظت برخی از اجزاء خوراک (مثل گلوکز که باعث تولید استات می‌شود) کنترل می‌شود تا با جلوگیری از تشکیل متابولیت جانبی از کاهش سرعت رشد و تولید جلوگیری شود. بهینه‌سازی محیط کشت در فرمانتور ناپیوسته، معمولترین و ساده‌ترین روش افزایش بهره‌دهی کلی تولید پروتئین‌های نوترکیب است و غالباً می‌توان با محیط کشت‌های پیچیده مثل کازامینواسیدها، پپتون و یا عصاره مخمر تولید پروتئین‌های نوترکیب را در مقیاس آزمایشگاهی بطور قابل توجهی افزایش داد. ولی بهرحال استفاده از محیط کشت‌های پیچیده بدلیل مشکل کردن فرآیندهای پایین‌دستی و در نتیجه افزایش هزینه‌های تولید و همچنین کاهش تکرارپذیری فرآیند و عدم تطابق با قوانین عملیات تولید خوب[1] GMP این روش مورد توجه صنعت نیست. لذا استفاده از محیط کشت‌های ساده به همراه یک یا چند اسیدآمینه برای رسیدن به بهره‌دهی بالاتر سلول و پروتئین نوترکیب برای صنعت جذاب‌تر است. متاسفانه اطلاعات کمی در این

[1] Good Manufacturing Practice (GMP)

زمینه وجود دارد. ولی تحقیقات انجام شده نقش موثر شرایط القاء و افزودن اسیدهای آمینه خاص روی تولید پروتئین‌های نوترکیب را نشان می‌دهد. ترکیب محیط کشت در زمان القاء روی تولید پروتئین تاثیر زیادی دارد از اینرو بعضاً با اضافه کردن غلظت‌های مناسبی از اسیدهای آمینه و یا پیش سازهای مناسب سعی می‌شود تولید پروتئین و یا محصول مورد نظر دیگر افزایش یابد.

بهینه سازی شرایط القاء بدلیل تاثیر گذاری قابل توجه روی افزایش دانسیته سلولی بعد از القا، و بازدهی تولید پروتئین نوترکیب بعنوان یک رویکرد اساسی در افزایش تولید پروتئین های نوترکیب همواره مورد توجه قرار دارد. تنظیم بیان ژن نوترکیب، مقدار القاگر، ترکیب محیط کشت در طی مدت القاء، زمان و طول مدت القاء، دمای القاء، و استفاده از لاکتوز بجای القاگر سمی IPTG از جمله راهکارهایی است که برای بهینه سازی شرایط القاء استفاده می شود. لذا در تولید پروتئین‌های نوترکیب سعی می‌شود برای هر سامانه بیان خاص شرایط مزبور بهینه شود.

ناپایداری (پلاسمیدی) سویه‌های نوترکیب تولید کننده پروتئین‌ها نیز مشکل ساز است. برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت به عنوان یک عامل انتخابی برای جلوگیری از رشد سلول‌های فاقد پلاسمید مدنظر می باشد. اما این روش به دلیل ملاحظات محیطی و هزینه استفاده از آنتی‌بیوتیک در مقیاس تولید انبوه مطلوب نمی باشد. بنابراین پلاسمیدهای پایدار در عدم حضور آنتی‌بیوتیک‌ها و روش‌های پایدار کننده پلاسمیدها از اهمیت بالایی برخوردار هستند. نکته دیگر اینکه ناپایداری پلاسمید با طولانی شدن زمان فرآیند بیشتر شده و در نتیجه مقدار بیان نیز کاهش می‌یابد، لذا برخی از محققین سعی کرده اند با اتخاذ روش خوراکدهی مناسب ضمن کاهش زمان فرآیند کشت غیرمداوم همراه با خوراکدهی ناپایدری پلاسمید را به حداقل کاهش دهند.

هدف اصلی در این تحقیق، توسعه یک روش کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شدهٔ مناسب، با استفاده از امکانات موجود، برای افزایش تولید اینترفرون گاما از باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب است. بطوریکه ضمن دستیابی به بالاترین بهره‌دهی کلی تولید پروتئین نوترکیب و دانسیته سلولی در حداقل زمان ممکن، پارامترهای تاثیرگذار تولید شامل پایداری پلاسمید، غلظت اجزاء خوراک (منابع کربن و نیتروژن)، غلظت متابولیت‌های جانبی در حد مطلوب حفظ شده و در نتیجه مشکلات روش‌های قبلی را تا حدود زیادی کاهش دهد. در این روش هدف اولیه افزایش تراکم سلولی، افزایش بازدهی ویژهٔ تولید محصول در تراکم سلولی بالا و رفع محدودیت‌های کشت با تراکم سلولی بالا بدون استفاده از روش‌های کنترل پیشرفته و یا روشهای حذف متابولیت جانبی می‌باشد. همچنین در ادامه به منظور افزایش بیشتر بهره‌دهی کلی فرایند سعی شده با بهینه سازی زمان و طول مدت القاء، و مقدار القاگر تولید اینترفرون گامای انسانی در کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی نوترکیب بیشینه شود.