

بیان افزایش یافته پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده از محیط کشت بهینه سازی شده

زهرا حاجی حسن^{۱*}، نوید نظری^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

امروزه پروتئین اکتیوین A به دلیل کاربردهای بالینی فراوان در درمان زخم و بیماری‌های تحلیل عصبی، در میزبان های بیانی متفاوتی به صورت نو ترکیب تولید شده است. از آنجاکه یکی از راه‌های افزایش تولید، رسیدن به تراکم سلولی بالا می باشد، لذا بهینه‌سازی محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور در این پژوهش غلظت عصاره مخمر و گلیسرول به‌عنوان منابع نیتروژن و کربن محیط کشت با استفاده از روش آماری RSM (روش سطح پاسخ)، برای دست‌یابی به بالاترین تراکم سلولی باکتری (*E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شده با وکتور *pET21a: Activin A* بهینه‌سازی شد. همچنین تأثیر نمک کلرید منیزیم ($MgCl_2$) بر روی میزان رشد باکتری مذکور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاضر نشان‌دهنده بالاترین تراکم سلولی (رشد) در غلظت ۴۲/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول، ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ می‌باشد. به‌علاوه نتایج دات بلات و آنالیز با نرم‌افزار Image J در این مطالعه نشان داد که میزان بیان پروتئین اکتیوین A نو ترکیب در شرایط بهینه‌شده نسبت به محیط کشت پایه افزایش قابل توجهی داشته است.

واژه‌های کلیدی: اکتیوین A، عصاره مخمر، گلیسرول، $MgCl_2$.

مقدمه

پروتئین اکتیوین A، پروتئینی از اعضای ابر خانواده‌ی فاکتورهای رشد تغییر شکل‌دهنده‌ی بتا (Transforming Growth Factor β) (TGF- β) می‌باشد. این پروتئین به‌صورت هومودایمیری از زیر واحدهای A و به‌صورت β_A/β_A می‌باشد که مونومرها در آن با پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند (Litwack, 2011; Stewar *et al.*, 1986). این پروتئین که توسط گنادها، جفت و سایر ارگان‌ها در بدن انسان تولید و ترشح می‌شود، در فرآیندهای سلولی متعددی از جمله رشد، تمایز، التهاب، آپوپتوز، حفظ و بقای سلول‌های عصبی شرکت می‌کند (Tsuchida *et al.*, 2009; Xia and Schneyer, 2009). از آنجاکه امروزه این پروتئین کاربردهای بالینی متعددی در ترمیم زخم، تمایز سلول‌های بنیادی و درمان بیماری‌های تحلیل عصبی پیدا کرده است (Shidaifat

۱- استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول: Hajihasan@ut.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

آن به‌ویژه به‌صورت نوترکیب حائز اهمیت می‌باشد. گزارش‌ها حاکی از بیان و تولید این پروتئین در میزبان‌های یوکاریوتی مثل CHO، مخمر پیکیا پاستوریس (Yam et al., 2001; Abdipranoto-Cowley et al., 2009; Antsiferova et al., 2012; Silva et al., 2014) لذا تولید مقادیر زیادی از آن به‌ویژه به‌صورت نوترکیب حائز اهمیت می‌باشد.

گزارش‌ها حاکی از بیان و تولید این پروتئین در میزبان‌های یوکاریوتی مثل CHO، مخمر پیکیا پاستوریس (Yam et al., 2001; Abdipranoto-Cowley et al., 2009; Antsiferova et al., 2012; Silva et al., 2014) لذا تولید مقادیر زیادی از آن به‌ویژه به‌صورت نوترکیب حائز اهمیت می‌باشد. گزارشی از بیان و تولید پروتئین در میزبان باکتریایی *E. coli* می‌باشد (حاجی حسن و همکاران، ۱۳۹۵). از آنجا که باکتری *E. coli* به دلیل سهولت کشت، بازده بالای بیان و ژنتیک شناخته‌شده، کاربرد گسترده‌ای در تولید پروتئین‌های نوترکیب پیدا کرده است، در این بررسی از سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) استفاده گردید (Chen, 2012). بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط القا مثل غلظت القاگر، دما و زمان القا، تولید پروتئین نوترکیب تولیدی را در این باکتری به میزان قابل توجهی افزایش خواهد داد (Azaman et al., 2010; Papaneophytou et al., 2012; Gholami Tilko et al., 2017). لذا در این بررسی به‌منظور دستیابی به بیشترین میزان تراکم سلولی و متعاقباً بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب اکتیوین A، منابع کربن و نیتروژن (گلیسرول و عصاره مخمر) و نمک $MgCl_2$ با استفاده از روش آماری (Response Surface Methodology) RSM یا همان روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند.

مواد و روش‌ها

گلیسرول و عصاره مخمر به ترتیب از شرکت بیوبیسیک (Biobasic) کانادا و کیولب (Quelab) کانادا خریداری شدند. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، آنتی‌بادی ضد دنباله پلی‌هیستیدینی و H_2O_2 از شرکت سیگما (Sigma) آمریکا خریداری شدند. کاغذ نیتروسولوز از شرکت میلی‌پور (Millipore) آمریکا خریداری شد و بقیه مواد و بافرها از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شدند.

سویه باکتری و وکتور

در این تحقیق از سویه باکتریایی *E. coli* BL21 (DE3) و وکتور بیانی pET21a(+) ساخت شرکت نواژن (Novagene) آمریکا استفاده گردید. سنتز cDNA اکتیوین A انسانی (کد NM_002192=NCBI) و متعاقباً کلون آن در وکتور مذکور توسط شرکت شاین‌جین (Shinegene) انجام شد. وکتور نوترکیب حاصله به روش شوک حرارتی به باکتری مربوطه ترانسفورم گردید (Sambrook et al., 2001).

تهیه محیط کشت

محیط کشت استفاده‌شده برای کشت شبانه، محیط SOB (Super Optimal Broth) (تریپتون ۲۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم بر لیتر، نمک NaCl ۰/۵ گرم بر لیتر، نمک $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار و نمک KCl ۰/۲ گرم بر لیتر) بود که $\mu\text{g/ml}$

۱۰۰ آنتی بیوتیک آمپی سیلین به آن افزوده شد. کشت شبانه به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انجام شد.

تعیین بهترین غلظت $MgCl_2$

به منظور به دست آوردن بهترین غلظت نمک کلرید منیزیم از محیط SOB بدون نمک $MgCl_2$ استفاده گردید (نمونه کنترل). سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ به صورت جداگانه به محیط کنترل اضافه گردید. پس از تلقیح میزان مساوی از کشت شبانه به هریک از محیط‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انکوبه شدند و جذب نوری آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis (ترمو (Thermo)) - ساخت آمریکا) در فواصل زمانی معین قرائت گردید.

بهینه‌سازی غلظت کربن (گلیسرول) و نیتروژن (عصاره مخمر) با استفاده از روش RSM

در این پژوهش برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی غلظت منابع کربن و نیتروژن محیط کشت از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده گردید. بهینه‌سازی دو متغیر (منبع کربن و نیتروژن) و آنالیز پاسخ (جذب در ۶۰۰ نانومتر یا همان تراکم سلولی^۱) با استفاده از نرم افزار ۷/۰ Design Expert (استاتاز^۲-آمریکا) انجام شد. معنی دار بودن مدل از طریق *F-test* ارزیابی شد. بدین منظور از غلظت‌های مختلف گلیسرول (۵ تا ۴۰ گرم بر لیتر) و عصاره مخمر (۵ تا ۸۰ گرم بر لیتر) طبق طراحی انجام شده توسط نرم‌افزار استفاده گردید. به هریک از محیط‌های کشت ۳۰ میلی مولار نمک $MgCl_2$ ، ۰/۵ گرم بر لیتر نمک NaCl و ۰/۲ گرم بر لیتر نمک KCl اضافه گردید و پس از تنظیم pH در ۷/۴، تلقیح باکتری از کشت شبانه (۱ درصد حجمی-حجمی) به هر یک صورت پذیرفت. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ به مدت ۱۲ ساعت انجام شد و میزان رشد یا تراکم سلولی با قرائت جذب در ۶۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A و تأیید آن با استفاده از تکنیک دات بلات (Dot Blot)

میزان ۱ درصد از کشت شبانه‌ی سویه *E. coli* BL21 (DE3) حاوی وکتور pET21a::Activin A به‌طور جداگانه به محیط SOB و محیط کشت بهینه‌شده توسط روش RSM اضافه گردید. کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ تا رسیدن به $OD=0/6$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد. پس از آن القای پروموتور T7 توسط غلظت ۱ میلی مولار IPTG صورت پذیرفت و انکوباسیون ۴ ساعت دیگر ادامه یافت. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، سلول‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و جمع‌آوری شدند. سپس کل محتوای پروتئینی با افزودن اوره ۸ مولار استخراج گردید. به‌منظور

¹ Cell Density

² Statease

³ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

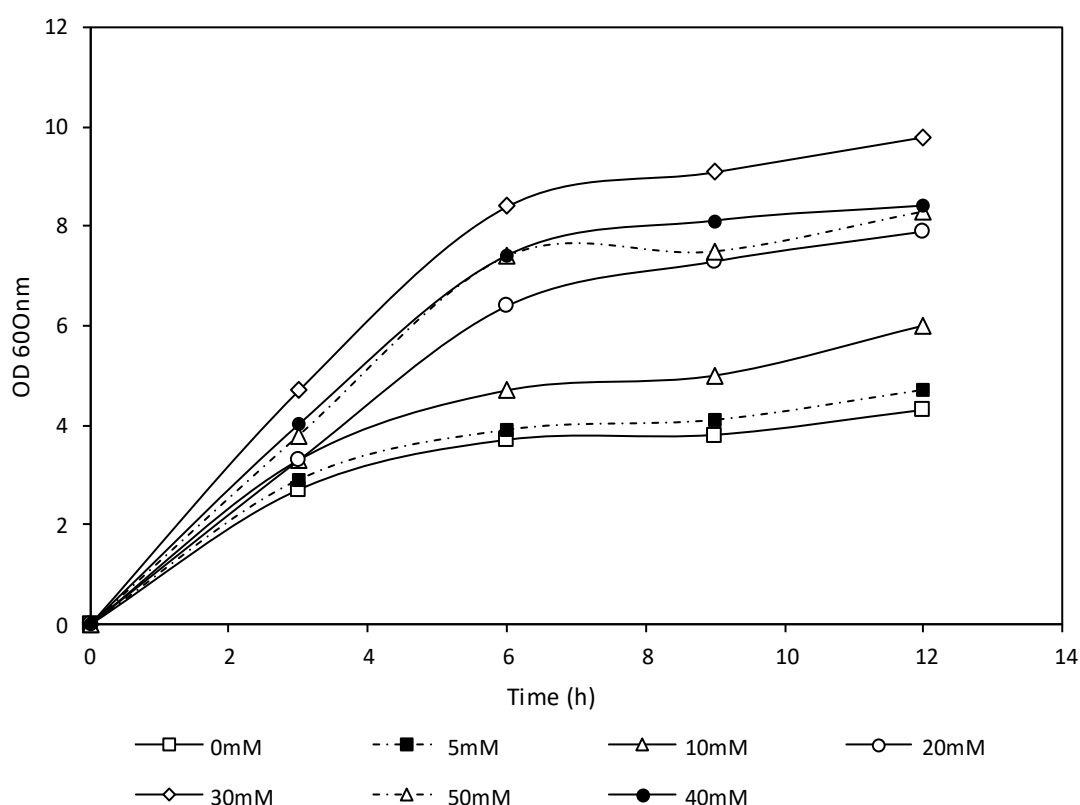
شکست سلولی از روش سونیکاسیون (۱۰ سیکل تکرار به فواصل ۱ دقیقه استراحت) استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی استخراج شده به مقدار مساوی بر روی کاغذ نیتروسلولوز لکه‌گذاری شدند. کاغذ توسط بافر بلوکه کننده TBS-T (نمک NaCl و Tris-HCl) و Tween 20 (حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی^۱ بلوکه شد. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله پلی‌هیستیدینی متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) با رقت ۱:۱۰۰۰ به کاغذ اضافه گردید. در پایان، کاغذ با DAB و پراکسید هیدروژن به‌عنوان سوبستراهای آنزیم HRP انکوبه گردید.

نتایج

تأثیر $MgCl_2$ بر رشد باکتری‌ها

گزارش‌ها حاکی از آن است که وجود نمک $MgCl_2$ برای رشد باکتری‌ها ضروری است (Lusk *et al.*, 1968; Hanlon *et al.*, 1982; Walker 1994; J. Cao *et al.*, 2009; Nierhaus 2014). لذا به‌منظور به دست آوردن بهترین غلظت $MgCl_2$ ، هفت غلظت مختلف از آن (۰ تا ۵۰ میلی‌مولار) تهیه و به محیط کشت SOB (نمونه کنترل بدون $MgCl_2$) اضافه گردید. پس از کشت باکتری‌ها در هر یک از محلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت و قرائت جذب در ۶۰۰ نانومتر، منحنی رشد در هر یک از حالات ترسیم شد (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود، کمترین میزان رشد در غلظت صفر میلی‌مولار از نمک $MgCl_2$ اتفاق می‌افتد ($nm=۴/۳$) و بهترین رشد در غلظت ۳۰ میلی‌مولار از نمک $MgCl_2$ می‌باشد ($nm=۹/۸$ OD ۶۰۰).

^۱ Skimmed Milk



شکل ۱: منحنی‌های رشد باکتری *E. coli* در غلظت‌های مختلف نمک کلرید منیزیم.

شایان ذکر است که غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ نه تنها تأثیر مثبتی بر روی کشت باکتری‌ها نداشته، بلکه آفت رشد را نیز باعث شده است. لذا در بقیه مراحل کار غلظت ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ به محیط کشت اضافه گردید.

بهینه‌سازی غلظت گلیسرول و عصاره مخمر با استفاده از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) RSM

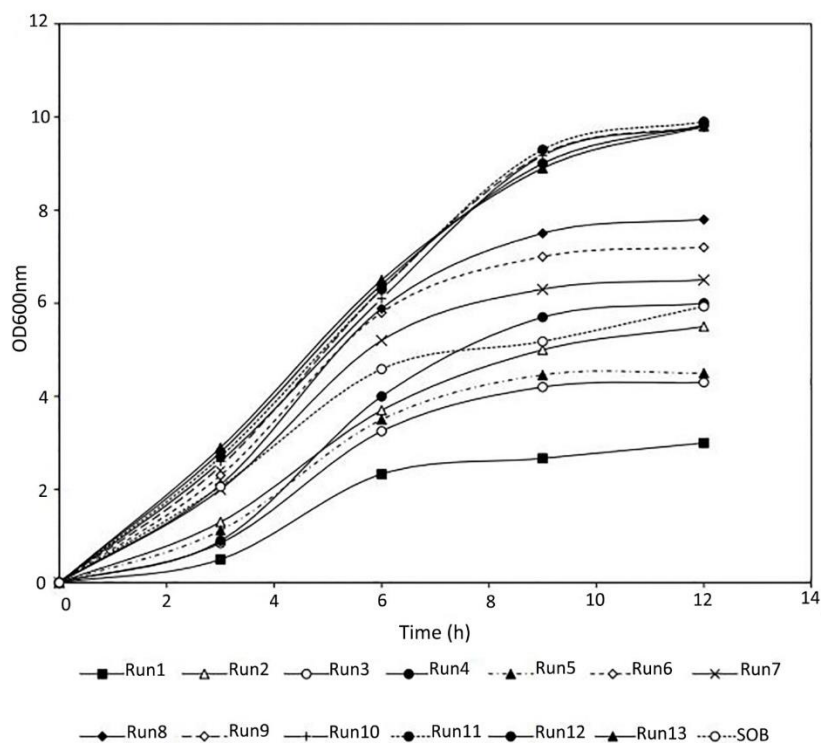
به منظور دستیابی به تراکم سلولی بالا در *E. coli*، به دست آوردن غلظت مناسبی از منابع کربن و نیتروژن از عوامل کلیدی و ضروری می‌باشد. بدین منظور در این مطالعه به ترتیب غلظت‌های ۵ تا ۸۰ و ۵ تا ۴۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر و گلیسرول به عنوان منابع نیتروژن و کربن انتخاب شدند و تأثیر هم‌زمان این دو متغیر بر روی تراکم سلولی یا همان رشد به عنوان پاسخ، به کمک نرم‌افزار Design Expert مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: آزمایش‌های طراحی شده توسط CCD برای بهینه‌سازی منبع کربن و نیتروژن.

آزمایش	پاسخ (۱) OD _{600nm}	غلظت گلیسرول (گرم بر لیتر)	غلظت عصاره مخمر (گرم بر لیتر)
۱	۳	-۱	۵/۰ g/l
۲	۵/۵	-۱	۸۰/۰ g/l
۳	۴/۳	+۱	۵/۰ g/l
۴	۶	+۱	۸۰/۰ g/l
۵	۴/۵	۰	۵/۰ g/l

۶	+۱	۸۰/۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۷/۲
۷	۰	۴۲/۵۰ g/l	-۱	۵/۰ g/l	۶/۵
۸	۰	۴۲/۵۰ g/l	+۱	۴۰/۰ g/l	۷/۸
۹	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸
۱۰	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۷۸
۱۱	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۹
۱۲	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸۳
۱۳	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸

با مشاهده جدول ۱ و شکل ۲ که منحنی ترسیم شده در هر یک از غلظت‌ها است، می‌توان چنین استنباط کرد که در غلظت‌های ۴۲/۵ گرم بر لیتر از عصاره مخمر و ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول بالاترین تراکم سلولی یا رشد اتفاق افتاده است؛ در این شرایط $OD_{600nm}=9/9$ می‌باشد. از طرف دیگر کمترین تراکم سلولی مربوط به کمترین غلظت در دو متغیر یعنی ۵ گرم بر لیتر می‌باشد.



شکل ۲: منحنی‌های رشد باکتری *E. coli* در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و گلیسرول مطابق با جدول یک

همچنین منحنی‌های برجسته ترسیم شده (شکل ۳) نشان می‌دهند که با افزایش غلظت عصاره مخمر و گلیسرول به ترتیب تا ۴۲/۵ گرم بر لیتر و ۲۲/۵ گرم بر لیتر تراکم سلولی افزایش می‌یابد و پس از آن با بالا رفتن غلظت دو متغیر تراکم سلولی کاهش می‌یابد.

Design-Expert®Software

OD600nm

● Design Points

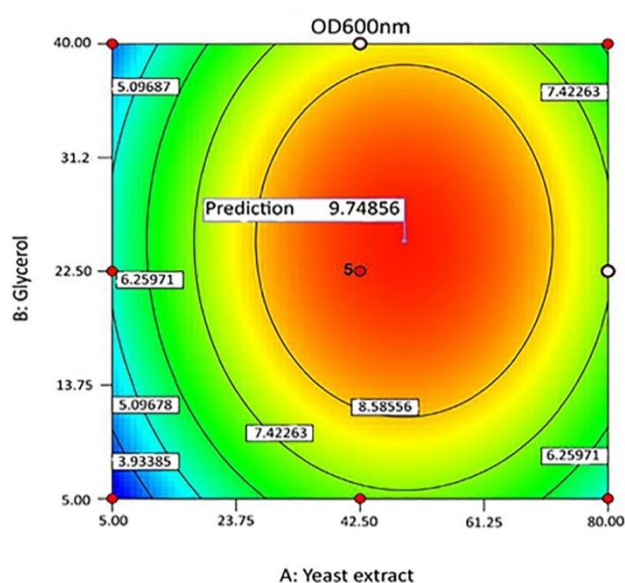
9.9

3

X1=A: Yeast extract

X2=B: Glycerol

(A):



Design-Expert®Software

OD600nm

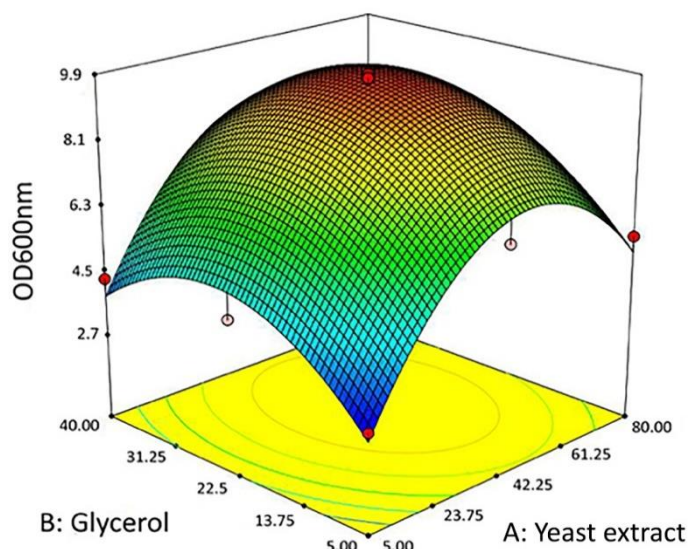
9.9

3

X1=A: Yeast extract

X2=B: Glycerol

(B):



شکل ۳: تأثیر هم‌زمان غلظت‌های مختلف گلیسرول و عصاره مخمر بر رشد سلولی باکتری *E. coli*: A: نمایش دوبعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری (تراکم سلولی). B: نمایش سه‌بعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری.

مقدار p -Value برای اصطلاح‌های غلظت عصاره مخمر (A)، غلظت گلیسرول (B) و توان دوم غلظت عصاره مخمر و گلیسرول (A^2) و (B^2) کمتر از ۰/۰۵ است که نشان‌دهنده اهمیت این اصطلاح‌ها در تولید بهینه تراکم سلولی می‌باشد (جدول ۲). همچنین مقدار $R^2=۰/۹۷۳۴$ (ضریب تشخیص^۱) برای معادله به‌دست‌آمده که عددی بزرگ‌تر از ۰/۸۰ می‌باشد، نشان‌دهنده همپوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار برای تولید بالاترین تراکم سلولی می‌باشد.

^۱ Coefficient of Determination

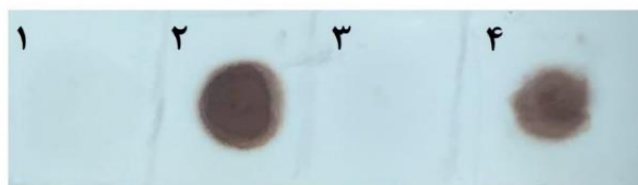
جدول ۲: تحلیل واریانس جهت ارزیابی مدل‌های پیشنهاد شده.

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی (df)	F-Value	P-Value (Probe>F)
A	۷/۹۳	۱	۳۲/۷۳	۰/۰۰۰۱
B	۱/۶۰	۱	۶/۶۱	۰/۰۳۳۱
A ^۲	۲۸/۹۴	۱	۱۱۳/۸۴	۰/۰۰۰۱
B ^۲	۱۰/۳۷	۱	۴۰/۷۷	۰/۰۰۰۴

بررسی بیان پروتئین اکتیوین A

به منظور بررسی تأثیر محیط کشت بهینه شده بر روی میزان بیان پروتئین اکتیوین A، سوبه باکتری BL21 (DE3) ترانسفورم شده با وکتور pET21a::Activin A در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۴۲/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول، ۳۰ میلی مولار نمک MgCl₂، ۰/۵ گرم بر لیتر نمک NaCl، ۰/۲ گرم بر لیتر نمک KCl کشت داده شد. از محیط SOB به عنوان محیط کنترل استفاده گردید. پس از اتمام مدت زمان بیان پروتئین و استخراج کل محتوای پروتئینی، میزان بیان در هر دو نمونه با کمک روش دات بلات و آنالیز با نرم افزار Image J (Liu *et al.*, 2012) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). همان طور که مشاهده می شود تولید پروتئین اکتیوین A در محیط کشت بهینه بیشتر از محیط کشت استاندارد SOB می باشد.

A:



B:

	محیط کشت SOB	محیط کشت بهینه
درصد تولید پروتئین اکتیوین A	۴۵/۱	۵۴/۹

شکل ۴: مقایسه میزان بیان در دو محیط کشت استاندارد و بهینه با کمک روش دات بلات و آنالیز آن با نرم افزار Image J. A: نتیجه آزمایش دات بلات با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag. لکه‌های ۱ تا ۴ به ترتیب کنترل منفی (*E. coli* وحشی بدون وکتور رشد داده شده در محیط بهینه شده)، *E. coli* ترانسفورم شده با وکتور و رشد داده شده در محیط بهینه، کنترل منفی (*E. coli* وحشی بدون وکتور رشد داده شده در محیط SOB) و *E. coli* ترانسفورم شده با وکتور و رشد داده شده در محیط استاندارد SOB. B: جدول به دست آمده از آنالیز لکه‌های دات بلات با استفاده از نرم افزار Image J.

بحث و نتیجه گیری

امروزه استفاده از باکتری *E. coli* به منظور تولید پروتئین های دارویی نو ترکیب بسیار رواج پیدا کرده است. ترکیب محیط کشت، شرایط رشد، غلظت القاگر و شرایط القاء از عوامل تأثیرگذار بر بازده نهایی تولید پروتئین نو ترکیب می باشد. کشت باکتری *E. coli* در تراکم سلولی بالا با استفاده از محیط های کشت متفاوت، غلظت های مختلف القاگر، دما و زمان های پس از القای متفاوت برای تولید پروتئین های متنوعی گزارش شده است (Larentis *et al.*, 2011; Papanephytou *et al.*, 2013; Gholami *et al.*, 2017). شایان ذکر است که در مورد هر پروتئین، بهینه شرایط ذکر شده در بالا متفاوت می باشد و بهتر است که بهینه سازی عوامل تأثیرگذار بر میزان تولید برای هر پروتئینی انجام شود. به طور مثال در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ توسط حاجی حسن و همکاران انجام شد، بهترین غلظت القاگرهای لاکتوز و IPTG، بهترین زمان و دمای پس از القا برای دستیابی به بیشترین میزان تولید اکتیوین A به دست آمد (Hajihassan and Biroonro, 2018). در سال ۲۰۰۸، ولنته و همکاران علاوه بر بررسی تأثیر محیط های کشت متفاوت LB^۱، TB^۲، SB^۳ و TY^۴ بر روی میزان رشد باکتری *E. coli* و تولید پروتئین نو ترکیب، تأثیر غلظت نمک NaCl را نیز بر میزان تولید، مورد مطالعه قرار دادند (Volontè *et al.*, 2008). همچنین در مطالعه ای که توسط سواری و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، تأثیر گلیسرول و اتانول بر میزان تولید پروتئین نو ترکیب هورمون رشد در *E. coli* بررسی شد. این افراد نشان دادند که گلیسرول و اتانول می توانند در غلظت های ۰/۶ مولار و ۳ درصد به عنوان چارپون های مصنوعی عمل کرده و تولید پروتئین محلول را افزایش دهند (Savari *et al.*, 2015). به علاوه در گزارش ارائه شده توسط لین گلیسرول به عنوان یک منبع کربن مناسب ارائه شده است (Lin, 1976). لازم به ذکر است که در بعضی از مطالعات از محیط کشت های مرکب و ارزان قیمت به منظور رسیدن به تراکم سلولی بالا و تولید پروتئین نو ترکیب استفاده شده است (جابری انصاری و همکاران، ۱۳۹۴). گزارش های بسیاری نیز نشان می دهد که عصاره مخمر هم به عنوان منبع کربن و هم به عنوان یک منبع نیتروژن عمل کرده و علاوه بر تأثیر بر رشد باکتری ها، بازده بیان و تولید پروتئین را نیز افزایش می دهد (Lee *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 1997). Cao *et al.*, 2013). لذا در مطالعه حاضر گلیسرول و عصاره مخمر به عنوان منابع کربن و نیتروژن انتخاب شدند و بهترین غلظت آن ها برای رسیدن به تراکم سلولی بالا با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) به دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت گلیسرول و عصاره مخمر به ترتیب تا ۲۲/۵ گرم بر لیتر و ۴۲/۵ گرم بر لیتر رشد افزایش می یابد و پس از آن با افزایش غلظت، رشد کاهش می یابد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر دانشمندان نیز مطابقت دارد، زیرا این افراد به اثر مهاری منابع کربن و نیتروژن در غلظت های بالا اشاره کرده اند (Vuillemin *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012). به علاوه برای رسیدن به تراکم

¹ Luria-Bertani medium

² Terrific Broth

³ Super Broth

⁴ Tryptone Yeast Extract

سلولی بالا حضور یون منیزیم ضروری است، به طور مثال نیرهاوس در سال ۲۰۱۴ در مقاله خود به تأثیر یون منیزیم بر پروتئین سازی اشاره کرده است. شایان ذکر است که وی در مطالعه خود تنها به این نکته اشاره کرده که در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میلی‌مولار یون منیزیم، تولید پروتئین بسیار کند خواهد بود، اما مناسب‌ترین غلظت این یون برای دستیابی به بالاترین رشد و تولید را به دست نیاورده است (Nierhaus, 2014).

لذا با توجه به اهمیت این یون، در مطالعه حاضر بهترین غلظت یون $MgCl_2$ برای رسیدن به بالاترین تراکم سلولی و بالطبع آن بیشترین میزان تولید پروتئین، به دست آورده شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۳۰ میلی‌مولار از این نمک بهترین رشد باکتری *E. coli* را خواهیم داشت و افزایش غلظت بیشتر تأثیر مثبتی بر رشد نخواهد داشت. به علاوه نتایج حاصل از دات بلات و نرم‌افزار Image J در بررسی میزان بیان پروتئین اکتیوین A نشان داد که در محیط بهینه‌شده از نظر غلظت گلیسرول، عصاره مخمر و یون منیزیم تولید پروتئین نو ترکیب اکتیوین A در مقایسه با محیط استاندارد SOB افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تهران تحت شماره گرنت ۲۸۶۶۹/۰۶/۰۸ به دکتر زهرا حاجی حس انجام شده است. همچنین نویسندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی با شماره طرح ۹۱۰۰۰۴۷۰ به منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Abdipranoto-Cowley, A., Park, J. S., Croucher, D., Daniel, J., Henshall, S., Galbraith, S. and Vissel, B. (2009) Activin A Is Essential for Neurogenesis Following Neurodegeneration. *Stem Cells*, 27: 1330–46.
- Antsiferova, M. and Werner, S. (2012) The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *Journal of Cell Science*, 125: 329–37.
- Azaman, S. N. A., Ramakrishnan, N. R., Tan, J. S., Rahim, R. A., Abdullah, M. P., and Ariff, A. B. (2010) Optimization of an induction strategy for improving interferon- $\alpha 2b$ production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 56: 141–150.
- Cao, J., Zhang, G., Mao, Z., Fang, Z., Yang, C., and Han, B. (2009) Influence of Mg^{2+} on the growth and activity of sulfate reducing bacteria. *Hydrometallurgy*, 95: 127–134.
- Cao, W., Li, H., Zhang, J., Li, D., Acheampong, D. O., Chen, Z., and Wang, M. (2013) Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study. *Protein Expression and Purification*, 90: 55–66.
- Chen, R. (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30: 1102–1107.

- Gholami Tilko, P., Hajihassan, Z., and Moghimi, H. (2017) Optimization of recombinant β -NGF expression in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47: 406–413.
- Hajihassan, Z. and Biroonro, N. (2018) Enhanced Expression of Recombinant Activin A in *Escherichia coli* by Optimization of Induction Parameters. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 29: 105 - 111.
- Hajihassan, Z., Hosseini, S. K. and Zomorodipour, A. (2016) Codon Optimization and Comparison of Recombinant Human Activin A Expression in BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3) Rosetta gami and BL21(DE3) Bacterial Hosts. *Modares Journal of Biotechnology*, 7: 50-60. (Persian)
- Hanlon, G. W., Hodges, N. A. and Russell, A. D. (1982) The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *Journal of General Microbiology*, 128: 845–851.
- Jaberi Ansari, F., Hajihassan, Z. and Jalili, H. (2015) Recombinant β -NGF production in *E.coli* using date syrup. *Modares Journal of Biotechnology*, 6: 60-70. (Persian)
- Larentis, A. L., Argondizzo, A. P. C., Esteves, G. dos S., Jessouron, E., Galler, R., and Medeiros, M. A. (2011) Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expression and Purification*, 78: 38–47.
- Lee, C., Sun, W.-J., Burgess, B. W., Junker, B. H., Reddy, J., Buckland, B. C., and Greasham, R. L. (1997) Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli* : effect of medium composition and induction timing on protein expression. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18: 260–266.
- Lin, E. C. C. (1976) Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 30: 535–578.
- Litwack, G. (2011) Activins and inhibins. Vol. 85, Academic Press, pp: 349. New york.
- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J. and Casaccia, P. (2012) Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nature Neuroscience*, 15: 1621–23.
- Lusk, J. E., Williams, R. J. P., and Kennedy, E. P. (1968) Magnesium and the Growth of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Biochemistry* 243: 2618-24.
- Nierhaus, K. H. (2014) Mg²⁺, K⁺, and the ribosome. *Journal of Bacteriology* 196: 3817–9.
- Papakonstantinou, T., Harris, S. J., Fredericks, D., Harrison, C., Wallace, E. M., and Hearn, M. T. W. (2009) Synthesis, purification and bioactivity of recombinant human activin A expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 64: 131–138.
- Papaneophytou, C. P. and Kontopidis, G. A. (2012) Optimization of TNF- α overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies. *Protein Expression and Purification*, 86: 35–44.
- Papaneophytou, C. P., Rinotas, V., Douni, E., and Kontopidis, G. (2013) A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in *Escherichia coli*: Purification and characterization of the protein. *Protein Expression and Purification*, 90: 9–19.
- Sambrook, J., Russell, D. W. and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp: 2100. LosAngeles

- Savari, M., Zarkesh Esfahani, S. H., Edalati, M., and Biria, D. (2015) Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method. *Protein Expression and Purification*, 114: 128–135.
- Shidaifat, F., Khamas, W., and Hailat, N. (2001) Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells. *Research in Veterinary Science*, 71: 23–25.
- Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S., and Lee, J. (1997) Enhanced Production of Human Mini-Proinsulin in Fed-Batch Cultures at High Cell Density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, 13: 249–57.
- Silva, A. W. B., Bezerra, F. T. G., Costa, J. J. N., Rossi, R. O. D. S., Passos, M. J., Vasconcelos, G. L. and Silva, J. R. V. (2014) Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*, 160: 199–207.
- Stewart, A., Milborrow, H., Ring, J., and Crowther, C. (1986) Human inhibin genes: genomic characterisation and sequencing. *FEBS Letters*, 206: 329-34.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Hitachi, K., Uezumi, A., Sunada, Y., Ageta, H., and Thomson, J. (2009) Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Communication and Signaling*, 7: 15-26.
- Volontè, F., Marinelli, F., Gastaldo, L., Sacchi, S., Pilone, M. S., Pollegioni, L., and Molla, G. (2008) Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 61: 131–137.
- Vuillemin, M., Malbert, Y., Laguerre, S., Remaud-Siméon, M., and Moulis, C. (2014) Optimizing the production of an α -(1→2) branching sucrose in *Escherichia coli* using statistical design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5173–84.
- Walker, G. M. (1994) The Roles of Magnesium in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14: 311–354.
- Xia, Y. and Schneyer, A. L. (2009) The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *The Journal of Endocrinology*, 202: 1–12.
- Yam, K., Yu, K., and Ge, W. (1999) Cloning and characterization of goldfish activin β A subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 154: 45-54.
- Yang, Y., Zhang, D., Liu, S., Jia, D., Du, G., and Chen, J. (2012) Expression and fermentation optimization of oxidized polyvinyl alcohol hydrolase in *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 99–104.

Increased expression of recombinant activin A using optimized cell culture medium

Z. Hajihassan^{1*}, N. Nazari²

Received:2017.09.06

Accepted:2019.01.02

Abstract

Nowadays recombinant activin A has been produced in different expression hosts because of its vast clinical applications. As obtaining the highest cell density is one way to increase the production, optimization of cell culture medium is necessary. So in this study, glycerol and yeast extract concentration as carbon and nitrogen sources of medium was optimized by using RSM (response surface methodology) in order to achieve the highest cell density of *E. coli* DE3 (21BL) strain transformed with pET21a:activin A vector. Furthermore, the effect of MgCl₂ on the growth of mentioned bacterium was studied. The results showed that the highest cell density (growth) was achieved in 42.5 g/L of yeast extract, 22.5 g/L of glycerol and 30 mM of MgCl₂. Also, dot blot results and data analysis with Image J in this study showed that the expression level of recombinant activin A in the optimized medium has been increased in comparison to standard cell culture medium.

Keywords: Activin A, Glycerol, Yeast extract, MgCl₂.

1-Assistant professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
* (Corresponding author: Hajihasan@ut.ac.ir)

2-M.Sc. student, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran