مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره اول (پیاپی ۲۶) بهار ۱۳۹۵
صفحات ۱۴-۶

Original Article

بهینه سازی بیان تولید پروتئین نوترکیب PapG.AcmA در سویه بیانی *اشریشیا کلی*

فاطمه اشرفی*[۱]، محمدرضا معصومیان[۲]، امیر میرزایی[۳]

[۱]مربی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، [۲] کارشناس ارشد، گروه فن آوری زیستی و علوم زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، [۳] دکتری، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن (UPEC) یکی از مهمترین باکتری های بیماری زاست که باعث عفونت مجاری ادراری می شود و هنوز هیچ واکسن انسانی علیه آن ساخته نشده است. هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب PapG به همراه پروتئین لنگری *لاکتوباسیلوس* به نام AcmA در *اشریشیا کلی* می باشد.

مواد و روش‌ها: ژن کدکننده PapG.AcmA در وکتور کلونینگ pEXA به صورت سنتتیک خریداری و در وکتور بیانی pET21a ساب کلون گردید. بیان پروتئین نوترکیب در میزبان بیانی *اشریشیا کلی* سویه اریگامی با روش SDS-PAGE و وسترن بلات مطالعه شد. تولید پروتئین فیوژن در مقیاس بالا تحت تاثیر ترکیب محیط کشت، غلظت‌های مختلف IPTG به عنوان القاگر و زمان القا در بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA بهینه‌سازی گردید.

یافته‌ها: با توجه به نتایج بهترین بیان در مقیاس بالا، توسط غلظت ۰/۱ میلی مولار IPTG در کدورت نوری ۳ =OD_{600nm} تعیین شد. محیط کشت پیچیده اصلاح شده حاوی گلوکز (٦ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۲۰ گرم بر لیتر)، تریپتون (۱۰ گرم بر لیتر)، KH_2PO_4 (۲/۳ گرم بر لیتر) و K_2HPO_4 (۱۲/۵ گرم بر لیتر) به عنوان محیط کشت بهینه تعیین گردید. بیشترین مقدار تولید بیومس و بیان پروتئین هدف در محیط کشت بهینه‌سازی شده به میزان ۵/۵ =OD_{600nm} تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کلون سازی و بیان ژن PapG.AcmA قابل انجام می باشد. همچنین استفاده از منبع کربن گلوکز در ترکیب محیط کشت پیچیده نسبت به محیط کشت LB بیان بهتری می‌دهد. در نهایت با تخلیص و ارزیابی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب، می توان از آن به عنوان یک کاندیدای واکسن استفاده نمود.

واژگان کلیدی: PapG.AcmA، بهینه سازی بیان، *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن.

دریافت مقاله: تیرماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: مهرماه ۹٤

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری (UTI) به اتصال باکتری های مولد و تهاجم به بافت های دستگاه ادراری اطلاق می شود (۱). UTI، یکی از شایع ترین عفونت ها در انسان محسوب می شود که تحت تاثیر جنسیت و سن قرار دارد. این عفونت علاوه بر هزینه های درمانی بالا ، سبب مرگ و میر بالا نیز در طیف های مختلف از اقشار جامعه می گردد (۲). تقریباً ۹۰ درصد از عفونت های UTI توسط سویه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) ایجاد می شود (۱ و ۲). اگر چه در ۹۵ درصد از موارد، مثانه مکان اصلی UTI محسوب می شود، اما این عفونت می تواند خود را از دستگاه ادراری پائینی به دستگاه ادرای بالائی رسانده و سبب پیلونفریت و حتی به دنبال آن باکتریمی، سپسیس و گاهی اوقات باعث مرگ نیز شود (۳). UPEC طیف وسیعی از فاکتورهای بیماری زایی عمومی و اختصاصی را دارا می باشد. این عوامل بیماری زا رشد باکتری

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۲۱۲۲۹٤۹۷۹۳ پست الکترونیک: mnfa.ashrafi@yahoo.com

را تسهیل و سبب بقای باکتری در داخل مجرای ادراری میزبان می شود (٤). از میان عوامل بیماری زا، انواع مختلف ادهسین به ویژه پیلی نقش بسیار اساسی دارد.

در چرخه بیماریزایی سویه های UPEC اتصال مرحله ضروری است. آغاز اتصال به سطوح مخاطی میزبان، تهاجم باکتری به سایر بخش های میزبان را در پی دارد (٥). فرآیند اتصال در این باکتری از طریق فیمبریه به خصوص فیمبریه های تیپ I و تیپ P روی می دهد.

برخلاف فیمبریه تیپ I که عمدتاً عفونت های نواحی تحتانی دستگاه ادراری را موجب می گردند، فیمبریه نوع P باعث ایجاد عفونت بالا رونده در دستگاه ادراری می شود. صعود عفونت ادراری از نواحی تحتانی به سمت نواحی فوقانی دستگاه ادراری، زمینه را برای گرفتاری بافت کلیه و ایجاد پیلونفریت حاد فراهم می نماید (٦). پیلی تیپ P فیمبریه مقاوم به مانوز است که *pap* نیز گفته می شود و از اصطلاح پیلی همراه با پیلونفریت گرفته شده است. این پروتئین دارای ۳ آلل متفاوت *papGI* ،*papGII* ،*papGIII* می باشد که غالباً با التهاب کلیه و لگنچه انسان همراه می باشد. فیمبریه تیپ P از شش پروتئین ساختاری تشکیل شده که پروتئین نوک پیلی (*papG*) برای جذب باکتری به داخل سلول های اپی تلیال کلیه ضروری است (۷ و ۸).

درمان کنونی به منظور کاهش و محدود نمودن عفونت های حاد ادراری بر پایه استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف استوار است. اما امروزه به دلیل افزایش روز افزون مقاومت های آنتی بیوتیکی و نیز اثرات سوء مصرف بیش از حد آن ها، نیاز به واکسن مناسب برای درمان آشکارتر می شود (۹).

تا به امروز واکسن های مختلفی به منظور پیشگیری از عفونت ادراری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک پیشنهاد شده است. اما هیچ کدام به مرحله فاز انسانی نرسیده است. این دلایل ضرورت طراحی واکسن های جدید علیه UTI را نشان می دهد (۵ و ۹).

از آنجایی که *اشریشیا کلی* یوروپاتوژنیک (UPEC) از مکانیسم های مختلفی برای غلبه بر میزبان و بقای خود استفاده می کند، یکی از کاندیداهای مناسب استفاده از واکسن های نوترکیب بر پایه آنتی ژن به صورت جذب سطحی بر سطح سلول های باکتریایی است (۱۰ و ۱۱).

پروتئین PapG به دلیل قدرت ایمنی زایی بالا و نداشتن تنوع زیاد در بین جدایه های بیماری زا و نیز نداشتن تغییر آنتی ژنیک و تشابه آنتی ژنی کاندید مناسبی برای تهیه واکسن می باشد (۸-٦). استفاده از پروتئین های نوترکیب فیوژن با یک پروتئین لنگری غشایی یک عرصه تحقیقی جدید است که کاربردهای بیوتکنولوژی مفیدی در زمینهٔ توسعه واکسن دارد. در مطالعات اخیر از باکتری های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس* های غیر بیماری زا و باکتری های اسید لاکتیک برای اهداف اتصال به پروتئین های هترولوگوس استفاده شده است (۱۱).

یکی از پروتئین های لنگری در *لاکتوباسیلوس*، AcmA می باشد که به عنوان یک پروتئین لنگری در کنار پروتئین PapG مورد استفاده قرار گرفته است. این پروتئین توانایی اتصال به سایر پروتئین ها و وارد کردن آن به غشای *لاکتوباسیلوس* را دارد. اگرچه امروزه، ارگانیسم ها و سیستم های بیانی متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، اما باکتری *اشریشیا کلی* اولین میزبانی بود که برای تولید داروی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. به نظر می رسد پیشرفت های قابل توجهی با استفاده از آن، در این حوزه از فناوری زیستی صورت گرفته است.

رشد سریع و سرعت بالای تولید پروتئین و دانش زیادی که در مورد فیزیولوژی *اشریشیا کلی* وجود دارد، به همراه ابزار کار آمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم های بیانی تبدیل کرده است (۱۲). برای تولید انبوه پروتئین نو ترکیب در باکتری *اشریشیا کلی*، نیاز به استفاده از یک محیط کشت غنی از مواد مغذی می باشد. محیط کشت LB، محیط کشت مناسب برای بیان پروتئین های نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلی* است. این محیط منبع کربن اختصاصی ندارد و رشد باکتری را تا تراکم های سلولی بالاتر از ٤-۲ OD_{600nm}= را تامین نمی کند. بنابراین

برای افزایش تراکم سلولی و در کنار آن افزایش بیان پروتئین، لازم است که تغییراتی در ترکیب محیط کشت انجام شود. در این پژوهش ترکیب و غلظت محیط کشت، مقدار غلظت القاگر، زمان القا نسبت به محیط کشت LB برای افزایش بازدهی تولید (بیومس) و بیان پروتئین PapG در سویه نوترکیب *اشریشیا کلی* که در مطالعات قبلی طراحی شده بود، در یک محیط کشت پیچیده اصلاح شده بهینه سازی گردید. این پژوهش با هدف بهینه سازی بیان تولید پروتئین نوترکیب PapG.AcmA در سویه بیانی *اشریشیا کلی* انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) ساخت سازه ژنی بیان کننده PapG.AcmA: سازه ژنی بیان کننده PapG که توانایی اتصال به باکتری *لاکتوباسیلوس* را داشته باشد، پروتئین PapG به صورت فیوژن با پروتئین لنگری AcmA *لاکتوباسیل* در وکتور pEXA طراحی گردید و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته و خریداری شد. در ابتدا، با استفاده از آنزیم های *Nde*I و *Eco*RI (فرمنتاز، لیتوانی) برش داده شد. قطعه ژنی PapG.AcmA خالص سازی و در وکتور بیانی pET21a (Biomatik، کانادا) ساب کلون گردید.

ب) تهیه باکتری مستعد E.coli BL21 (DE3) و ترانسفورماسیون: به منظور تهیه باکتری مستعد از سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3)، ابتدا کشت شبانه از این باکتری در محیط کشت LB Broth در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انجام شد. روز بعد یک ارلن با حجم ۳ تا ۵ برابر حجم محیط کشت انتخاب و پس از ریختن محیط کشت LB broth استریل در حجم مناسب، به مقدار ۱/۱۰۰۰ حجم آن از کشت شبانه اضافه شد تا به چگالی نوری (OD) ۰/۳۵ تا ۰/٤ برسد.

مستعد سازی غشای باکتری برای پذیرش پلاسمید حاوی توالی مورد نظر نیز به کمک کلرید کلسیم ۲۰ میلی مولار انجام گرفت. به منظور ترانسفورماسیون، ۵۰ نانوگرم از پلاسمید حاوی توالی مورد نظر به ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری های مستعد اضافه شد و عمل ترانسفورماسیون به کمک شوک حرارتی انجام گرفت. غربالگری باکتری های ترانسفورم شده به کمک آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ µg/ml) صورت گرفت.

ج) بیان سازه ژنی حاوی PapG.AcmA: سویه بیانی *اشریشیا کلی* Origami برای بیان پروتئین فیوژن PapG.AcmA مورد استفاده قرار گرفت. کشت تازه باکتری ترانسفورم شده با وکتور pET21a حاوی ژن کننده PapG.AcmA با غلظت 1 mM از IPTG القا شده و به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. به دنبال آن بیان پروتئین مورد نظر توسط روش SDS-PAGE و وسترن بلات تایید شد.

د) وسترن بلات: برای تایید نهایی پروتئین نوترکیب مورد نظر از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. در این بررسی با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال و ضد دنباله هیستیدینی استفاده شد.

ه) بهینه سازی بیان پروتئین فیوژن PapG.AcmA: در ابتدا از محیط کشت LB (حاوی پپتون ۱۰ g/l، عصاره مخمر ۵ g/l و کلرید سدیم ۵ g/l) (مرک، آلمان) برای تهیه بانک سلولی و تهیه مایه تلقیح استفاده شد. اگرچه تاکنون هیچ گزارشی در مورد بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA در محیط کشت پیچیده ارائه نشده است، اما مطالعات قبلی نشان می‌دهد مواد مناسب مورد استفاده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دیگر عبارتند از: منبع کربن (گلوکز، گلیسرول، ساکارز، لاکتوز)، تریپتون، عصاره مخمر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدرژن فسفات (۱۳ و ۱٤).

باکتری *اشریشیا کلی* در دامنه وسیعی از شرایط محیطی مانند دمای ۲۵ تا ٤۰ درجه سلیسیوس، ٦/۵ تا ۸/۵ pH و دور همزن ۱۵۰ rpm تا ۲۵۰ قادر به رشد می‌باشد. با توجه به تحقیقات قبلی، باکتری در شرایط دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، ۷ pH و دور همزن ۲۵۰ rpm تکثیر گردید (۱٤ و ۱۵). محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. به محیط کشت استریل متناسب با وکتور مورد استفاده، معمولاً آنتی‌بیوتیکی افزوده می‌شود تا امکان انتخاب پذیری سلول‌های حاوی پلاسمید را فراهم نماید. در این تحقیق از آمپی‌سیلین و

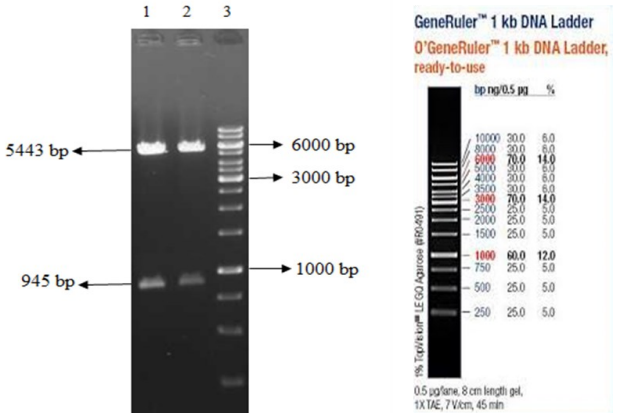
تراسیکلین به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده گردید (۱۵). میزان رشد سلول‌ها از طریق جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به منظور جداسازی سلول‌ها، میکروتیوب‌های پر شده (۱ میلی لیتر) حاوی سلول *اشریشیا کلی* با دور همزن ۱۲۰۰۰ rpm، زمان ۵ دقیقه و دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. تمامی آزمایشات انجام شده در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر، با نسبت ۲/۵ به ۱ (۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت) انجام گردید.

برای بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA در کشت فلاسک چندین پارامتر مورد مطالعه قرار گرفت. این پارامترها شامل محیط کشت‌هایی با مکمل‌های کربنی متفاوت (گلوکز، ساکارز، لاکتوز)، مقدار غلظت القاگر (ایزو پروپیل تیوگالاکتوزید یا IPTG)، زمان القا و غلظت‌های مختلف مکمل کربنی (۳، ٦ و ۹ گرم بر لیتر) مورد استفاده قرار گرفت. تأثیر تمام پارامترها در بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA هم به صورت مجزا و هم در ارتباط با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت ترکیبات دیگر محیط کشت، طبق گزارشات قبلی ثابت در نظر گرفته شد، که عبارتند از: yeast extract:20gr/ ،KH_2PO_4:2.3gr/l ،K_2HPO_4:12.5 l/rg Tryptone:10gr/ l. همچنین غلظت‌های متفاوت IPTG (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) برای بیان پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت (١٤). پس از اتمام زمان القا و جمع‌آوری سلول‌ها، به هرکدام از میکروتیوپ‌ها ۳۵ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد و به کمک ورتکس به خوبی، هم زده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش (دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس) حرارت داده شد تا سلول‌ها لیز شوند. به منظور انجام الکتروفورز، از سیستم الکتروفورز (شرکت BIORAD، UK) استفاده شد. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک های ژل اکریل آمید-بیس اکریل آمید ۱۲/۵ درصد ریخته شدند و با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت در دستگاه الکتروفورز انتخاب گردید. سپس ژل‌ها با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و باندهای پروتئینی مشاهده و بررسی شدند (١٦). در این مطالعه از مارکر پروتئینی شرکت فرمنتاز استفاده گردید.

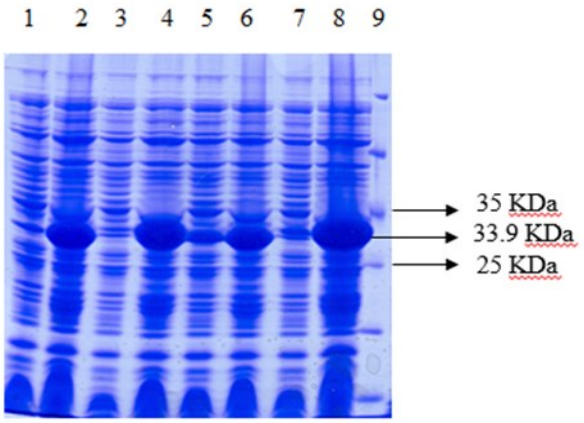
یافته ها

الف) ساخت سازه ژنی بیان کننده PapG.AcmA: به دنبال ساخت سازه ژنی pET21a-PapG.AcmA، صحت ساخت سازه توسط برش دو آنزیمی *Nde*I-*Eco*RI تایید شد. نتایج ژل الکتروفورز برش آنزیمی نشان می دهد که قطعه ژنی ۹٤۵ جفت بازی مربوط به PapG.AcmA و قطعه ۵٤٤۳ جفت بازی مربوط به وکتور pET21a می باشد (شکل ۱).

ب) بیان سازه ژنی حاوی PapG.AcmA: سویه Origami *اشریشیا کلی* حاوی وکتور pET21a-PapG.AcmA با غلظت



شکل ۱: نتیجه برش آنزیمی وکتور حاوی pET21a-PapG.AcmA با دو آنزیم *Nde*I.*Eco*RI. ستون های ۱ و ۲) نمونه هضم شده آنزیمی، ستون ۳) مارکر 1Kb.



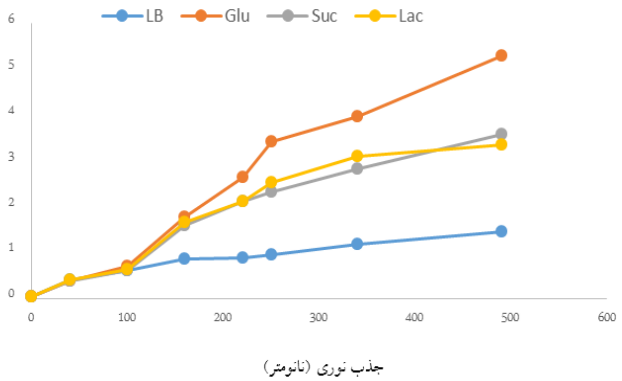
شکل ۲: نتیجه بیان پروتئین فیوژن PapG.AcmA در ژل SDS-PAGE. ستون های ۱، ۳، ۵ و ۷) نمونه های القا نشده، ستون های ۲، ٤، ٦ و ۸) نمونه های القا شده، ستون ۹) مارکر پروتئینی.

۱ میلی مولار از IPTG القا گردید. نتایج بیان پروتئین مورد نظر با روش SDS-PAGE و تایید آن با وسترن بلات در شکل های ۲ و ۳ آورده است. پروتئین فیوژن مورد نظر اندازه ای در حدود ۳۳/۹ کیلو دالتون داشت.

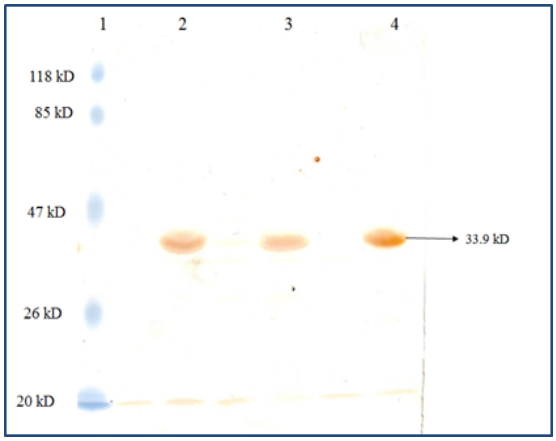
ج) بهینه سازی بیان پروتئین فیوژن PapG.AcmA: منابع کربنی متفاوتی نسبت به محیط کشت LB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که منبع کربنی گلوکز بیشترین تاثیر را بر روی رشد باکتری نوترکیب مورد نظر داشت (نمودار ۱). نتایج نشان داد اضافه کردن منبع کربنی گلوکز به ترکیب محیط کشت پیچیده باعث بیان بهتر محصول نسبت به منابع کربنی دیگر می‌شود (نمودار ۲).

در این مطالعه هم چنین غلظت های مختلف قند گلوکز نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار رشد سلول مربوط به محیط کشت حاوی گلوکز با غلظت ۶ g/l می‌باشد (شکل ٤). نتایج تأثیر غلظت القاگر IPTG بر بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند غلظت‌های زیاد IPTG، تأثیری در بیان پروتئین ندارد، همچنین، به دلیل هزینه بالای پودر IPTG، می‌توان از غلظت پایین برای بیان این پروتئین استفاده نمود.

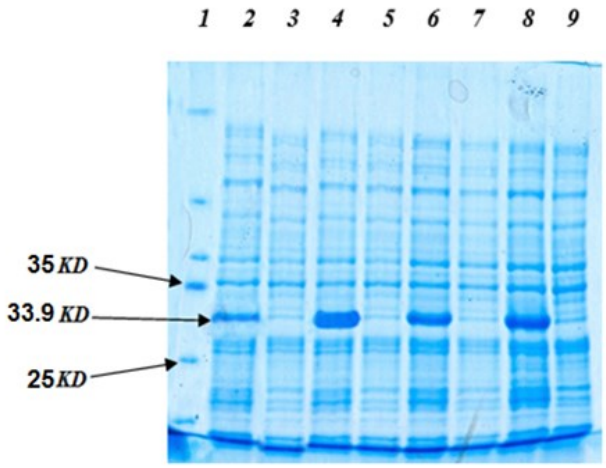
شکل ٦ تأثیر غلظت بیومس در میزان بیان پروتئین در زمان القا را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار تولید بیومس در زمان القا با OD_{600nm}= ۳ تعیین گردید. در یک محیط کشت یکسان، زمانی که مقدار جذب نوری به



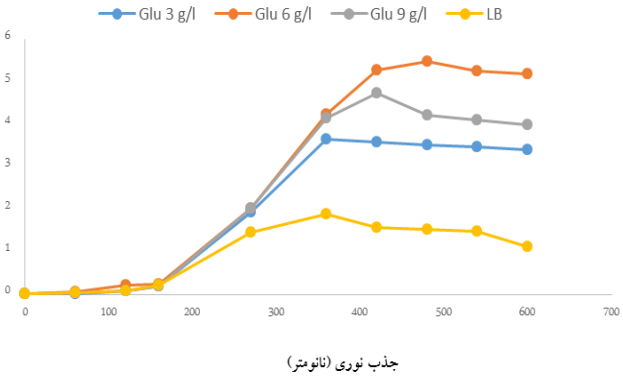
نمودار ۱: منحنی رشد باکتری در محیط کشت پیچیده با منابع کربنی متفاوت.



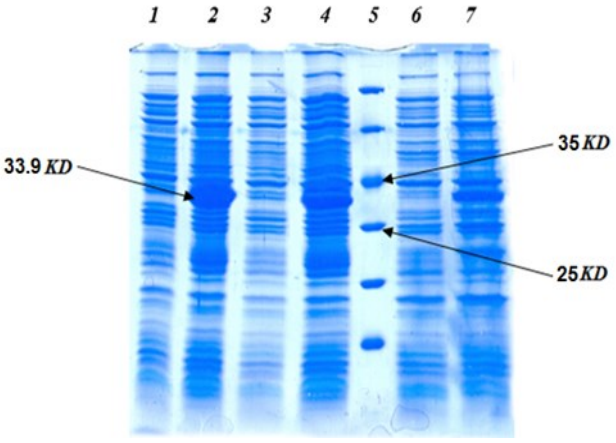
شکل ۳: وسترن بلات نمونه های پروتئینی. ستون ۱) ماکر پروتئین، ستون های ۲ تا ٤) نمونه های مثبت.



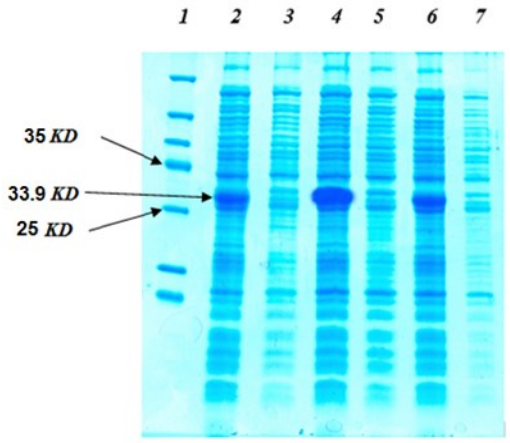
شکل ۴: بیان پروتئین PapG.AcmA در محیط کشت پیچیده با منابع کربنی متفاوت. ستون ۱) مارکر پروتئینی، ستون های ۲ و ۳) محیط کشت با منبع کربنی LB، ستون های ٤ و ۵) محیط کشت با منبع کربنی گلوکز، ستون های ٦ و ۷) محیط کشت با منبع کربنی لاکتوز، ستون های ۸ و ۹) محیط کشت با منبع کربنی ساکاروز.



نمودار ۲: منحنی رشد باکتری در محیط کشت های پیچیده.



شکل ۵: تاثیر غلظت IPTG در بیان پروتئین PapG.AcmA. ستون های ۱ و ۲) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت بعد از القا با IPTG با غلظت ۰/۱ میلی مولار، ستون های ۳ و ٤) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت پس از القا با IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مولار، ستون ۵) مارکر پروتئینی، ستون های ٦ و ۷) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت پس از القا با IPTG با غلظت ۱ میلی مولار.



شکل ۶: تاثیر غلظت بیومس در زمان القا در بیان پروتئین PapG.AcmA. پروتستون ۱) مارکر پروتئینی، ستون های ۲ و ۳) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت بعد از القا با IPTG با وزن ۱/۵ گرم بر لیتر از بیومس، ستون های ٤ و ۵) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت پس از القا با IPTG با وزن ۳ گرم بر لیتر از بیومس، ستون های ٦ و ۷) به ترتیب نمونه های قبل از القا و ٤ ساعت پس از القا با IPTG با وزن ۳/۵ گرم بر لیتر از بیومس.

عدد ۳ می‌رسد، بیان بهتری نسبت به جذب نوری‌های دیگر مشاهده شد.

بحث

در این پژوهش نوع محیط کشت به عنوان یکی از عوامل مهم به منظور فراهم کردن محیط مناسب برای رشد بهینه باکتری و همچنین، تولید بیشتر پروتئین هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه سه نوع محیط کشت با منبع کربنی متفاوت استفاده شد. کولینز (Collins) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای نشان دادند که یکی از عوامل مؤثر در تولید پروتئین Silk–elastin–like نوترکیب، محیط کشت می‌باشد. یافته های آنها حاکی از استفاده از محیط کشت کمپلکس غنی از عصاره مخمر، بافر و منبع کربنی (گلیسرول) به عنوان محیط کشت بهینه برای بیان پروتئین SELPs بود (١٤).

همچنین فانگ (Fong) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت توانستند بهترین محیط کشت را برای بیان پروتئین Elastin-like polypeptides (ELPs) انتخاب نمایند (۱۷). در پژوهش دیگری که ولز (Velez) و همکاران برای تولید پنی سیلینG در سویه نوترکیب *اشریشیا کلی* انجام دادند با تغییرات محیط کشت و شرایط آن به مقدار قابل توجهی بازدهی محصول را افزایش دادند (۱۸). در این پژوهش انواع محیط کشت با غلظت‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. انتخاب محیط کشت حاوی گلوکز با غلظت ٦ گرم بر لیتر به منظور افزایش توده سلولی و تولید زیاد پروتئین نوترکیب صورت گرفت. نتایج نشان داد که نوع محیط کشت مؤثرترین عامل است و محیط کشت پیچیده همراه با گلوکز ٦ گرم بر لیتر به دلیل افزایش زیاد توده سلولی و در نتیجه تولید زیاد پروتئین محصول، به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت شناخته شد.

مقدار القاگر از جمله عوامل مهمی است که بر روی میزان بیان پروتئین نوترکیب اثر می‌گذارد. زمان القا نیز از عوامل مهم در بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب می‌باشند. زیرا بازدهی تولید پروتئین نوترکیب به نقطه‌ای از تابع رشد که القا صورت می‌گیرد وابستگی زیادی دارد (۱۹ و ۲۰). بررسی منحنی رشد بدون القا

و همراه با القای سویه نوترکیب تهیه شده نشان داد که بهترین زمان القا در این سویه نوترکیب ابتدای فاز لگاریتمی و در OD_{600nm}= ۳ است. نتایج آزمایش‌ها و بهینه‌سازی لسینا (Lecina) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در شرایط تولید نشان داد که مقدار IPTG تأثیر زیادی بر بازدهی تولید پروتئین نوترکیب ندارد و غلظت زیاد آن باعث سمیت در محیط کشت می شود که نهایتاً منجر به محدود شدن زمان رشد سلول می گردد (۲۱). نتایج پژوهش حاضر نیز تایید کننده مطالعات انجام شده قبلی بود. بنابراین به دلیل قیمت بالای IPTG و همچنین اثر سمی آن در تولید پروتئین دارویی، مقدار کمتر IPTG (۰/۱ میلی مولار) برای بیان پروتئین نوترکیب PapG.AcmA پیشنهاد و انتخاب گردید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه پس از بهینه‌سازی شرایط بررسی شده محیط کشت پیچیده اصلاح شده حاوی گلوکز (٦ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۲۰ گرم بر لیتر)، تریپتون (۱۰ گرم بر لیتر)، KH_2PO_4 (۲/۳ گرم بر لیتر) و K_2HPO_4 (۱۲/۵ گرم بر لیتر) به عنوان محیط کشت بهینه، غلظت ۰/۱ میلی مولار IPTG و زمان القا در جذب نوری OD_{600nm}= ۳ تعیین گردید. استفاده از محیط کشت پیچیده حاوی گلوکز نسبت به محیط کشت LB و منابع کربنی گزارش شده دیگر، بیان بالاتری می‌دهد. همچنین، غلظت بیومس تولیدی در حدود ۱۱/۸ گرم بر لیتر در محیط کشت پیچیده اصلاح شده تعیین گردید. این میزان نسبت به محیط کشت LB به مقدار ۳/۵ برابر افزایش نشان می‌دهد که می‌تواند از نظر اقتصادی قابل توجه باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی همکاران دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Hooton TM. Recurrent urinary tract infection in women. Int J Antimicrob Agents. 2001; 17(4): 259-268.

2. Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol. 2005; 43(12): 6064-6072.

3. Dodson KW, Pinkner JS, Rose T, Magnusson G, Hultgren SJ, Waksman G. Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesion to its human kidney receptor. Cell. 2001; 105(6): 733-743.

4. Yasmeen Kausar SKC, Nadagir SD, Halesh LH, Chandrasekhar MR. Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. J Med Sci. 2009; 2(1): 47-55.

5. Snyder JA, Lloyd AL, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. Infect Immun. 2006; 74(2): 1387-1393.

6. Lane MC, Mobley HLT. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney Int. 2007; 72(1): 19-25.

7. Al-Mayahie SMG. Vaginal colonization by papG allele II(+) *Escherichia coli* isolates from pregnant and non-pregnant women as predisposing factor to pyelonephritis. Infect Dis Obstetrics Gynecol. 2013; Article ID 860402.

8. Roberts JA, Kaack MB, Baskin G, Chapman MR, Hunstad DA, Pinkner JS. Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. J Urol. 2004; 171(4): 1682-1685.

9. Liu MA. DNA vaccines: a review. J Intern Med. 2003; 253(4): 402-410.

10. Raha AR, Varma NRS, Yusoff K, Ross E, Foo HL. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 68 (1): 75-81.

11. Song D, Gu Q. Surface expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene E fragment on *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A. Biotechnol Lett. 2009; 31(7): 985-989.

12. Swartz JR. Advances in *Esherichia coli* production of therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol. 2001; 12: 195-201.

13. Varedi Koolaee SM, Shojaosadati SA, Babaeipour V, Ghaemi N. Physiological and morphological changes of recombinant *E. coli* during over-expression of human interferon-g in HCDC. Iran J Biotech. 2006; 4: 230-238.

14. Collins T, Azevedo-silva J, Costa A, Branca F, Machado R, Casal M. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimization. Microb Cell Fact. 2013; 1: 12-21.

15. Chong M, Leung R, Wong C, Yuen A. The effects of ampicillin versus tetracycline on the plasmid. Microbial Immunol. 2003; 3: 87-95.

16. Zeinoddini M. Theoretical and practical guide to protein analysis methods.1st.Tehran Malek Ashtar University of Technology press, 2011; pp: 1-30.

17. Fong BA, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. Microbe cell Fact. 2010; 77: 9-16.

18. Vélez AM, da Silva AJ, Luperni Horta AC, Sargo CR, Campani G, Gonçalves Silva G, de Lima Camargo Giordano R, Zangirolami TC. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in r *E. coli* Fed-batch cultivations. BMC Biotechnol. 2014; 21: 6-14.

19. Muntari B, Amid A, Mel M, Jami MS, Salleh HM. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*. AMB Express. 2012; 2: 12.

20. Kelley KD, Olive LQ, Hadziselimovic A, Sanders CR. Look and see if time to induce protein expression in *Escherichia coli* cultures. Biochem. 2010; 49: 5405-5460.

21. Lecina M, Sarro E, Casablancas A, Godia F, Caire J. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. Biochem Eng J. 2013; 70: 78-83.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 1, April 2016

Original Article

Optimization the expression of PapG.AcmA recombinant protein in *Escherichia coli* System

Fatemeh Ashrafi[1], Mohammad Reza Masomian[2], Amir Mirzaie[3]

[1]Lecturer, Department of Biology, Tehran North branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] MS.c., Department of Biotechnology and Biosciences, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
[3] Ph.D., Young Researchers and Elite Club, East Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is one of the most common bacteria to cause urinary tract infection (UTI). No human vaccine against UTI has yet been developed. The aim of this study was to optimize the expression of recombinant PapG with *Lactobacillus* anchor protein AcmA in *E. coli*.

Materials & Methods: The synthetic cloning vector, pEXA containing PapG.AcmA was purchased and subcloned into pET21a vector. The protein expression levels in Origami expression host (*E. coli*) were analyzed by SDS-PAGE gel and western blotting. Moreover, various concentrations of IPTG (Isopropyl Thiogalactopyranoside), the medium component and induction time was optimized for large scale expression of recombinant protein.

Results: Based on results, optimum expression in large scale was occurred in 0.1mM IPTG and OD= 3 optical density. The modified complex culture medium containing: glucose 6 g/I, K_2HPO_4 12.5 g/l, KH_2PO_4 2.3 g/l, Yeast Extract 20 g/l, tryptone 10 g/l were determined as optimal medium. OD 600nm= 3.0 was determined as the best time for induction by IPTG at a concentration of 0.1 mM. The levels of the expression of the target protein was determined at OD600nm= 5.5.

Conclusion: Based on the result, we were able to do cloning and expression of PapG.AcmA. Addition of extra carbon source (glucose) to the complex medium caused a better PapG.AcmA recombinant protein expression. Finally, by purification of recombinant protein and evaluation of its immunogenicity, it can be used as a vaccine candidate against the urinary tract infection.

Keywords: PapG.AcmA, Expression optimization, Uropathogenic *Escherichia coli.*

Correspondence to: Fatemeh Ashrafi

Tel: +982122949793

E-mail: mnfa.ashrafi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(1): 6-14.