JSST Journal of Space Science and Technology

Vol. 15 / Issue 4 / 2022 / (No. 54)
Print ISSN: 2008-4560 / Online ISSN: 2423-4516
https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1396

OPEN ACCESS

Pages: 97-106 / Research Paper / Received: 13 April 2022 / Revised: 24 August 2022 / Accepted: 24 August 2022

Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

Heterologous Expression of Shiga-Like Toxin Type 2 in Microgravity Condition

Maryam Salavatifar[1]*, Niloofar Mosallaei[2] and Ali Hatef Salmanian[3]

1. Assistant Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran

2. Ph.D. Student, Department of Biology, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran

3. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Corresponding Author's E-mail: salavati.ari.ac.ir

Abstract

Gravity is an influential force on living organisms on earth, including microorganisms. E. coli O157: H7 causes complications such as bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome in humans and immunization is the main way to fight it. Subunit B of Shiga-like toxin type 2 (STX2B), binding agent of bacterial toxin to target cells, is a candidate for the recombinant vaccine to prevent disease. Due to the quantitative and qualitative increase in the expression of some recombinant proteins under microgravity, the STX2B recombinant protein expression was examined under simulated microgravity conditions on clinostat device. After confirmation of the recombinant by immunological methods, its expression was performed under microgravity and after the protein purification by chromatographic column, its amount was measured. The results showed that despite the decrease in expression under microgravity, which was probably due to lack of proper aeration of the culture medium, recombinant protein was still produced under microgravity condition.

Keywords: Simulated microgravity, E. coli O157: H7 bacteria, Hemolytic uremic syndrome, StxB recombinant protein

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

How to cite this article:
M. Salavatifar, N. Mosallaei and A. H. Salmanian, "Heterologous Expression of Shiga-Like Toxin Type 2 in Microgravity Condition," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 15, No. 4, pp. 97-106, 2022 (in Persian), https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1396.

JSST
علوم و فناوری فضایی

دوره ۱۵ / شماره ۴ / ۱۴۰۱ / (پیاپی ۵۴)
شاپای چاپی: ۴۵۶۰-۲۰۰۸ / شاپای الکترونیکی: ۴۵۱۶-۲۴۲۳
https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1396

OPEN ACCESS

ص. ص. ۱۰۶-۹۷ / مقاله علمی- پژوهشی / دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴ / بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲ / پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲

Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

بیان هترولوگ سم شبه شیگا نوع ۲ در شرایط میکروگراویتی

مریم صلواتی‌فر[۱*]، نیلوفر مصلایی[۲] و علی هاتف سلمانیان[۳]

۱- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

۲- دانشکدهٔ زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۳-پژوهشکده زیست کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری ایران، تهران، ایران

***ایمیل نویسنده مخاطب: salavati@ari.ac.ir**

چکیده

جاذبه نیرویی تأثیرگذار بر جانداران ساکن کره زمین از جمله میکروارگانیسم‌هاست. باکتری E. coli O157:H7 عوارضی مانند اسهال خونی و سندرم اورمی همولیتیک را در انسان ایجاد نموده و ایمن سازی اصلی‌ترین راه مبارزه با آن است. زیر واحد B سم شبه شیگا نوع ۲ (STX2B) که عامل اتصال سم باکتری به سلول‌های هدف است، از کاندیدهای واکسن نوترکیب پیشگیری از بیماری است. نظر به افزایش کمّی و کیفی بیان برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط بی‌وزنی، میزان بیان پروتئین نوترکیب STX2B در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی دستگاه کلینواستت مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأئید پروتئین نوترکیب با روش‌های ایمنولوژیک، بیان آن در شرایط بی‌وزنی انجام شد و پس از تخلیص پروتئین توسط ستون کروماتوگرافی، مقدار آن مورد سنجش قرار گرفت. نتایج یافت شده نشان دادند که به‌رغم کاهش میزان بیان در شرایط بی‌وزنی که احتمالاً به‌دلیل عدم هوادهی مناسب محیط کشت بوده است، هم چنان پروتئین نوترکیب در شرایط بی‌وزنی تولید شد.

واژه‌های کلیدی: بی‌وزنی شبیه سازی شده، باکتری *E. coli* O157:H7، سندرم اورمی همولیتیک، پروتئین نوترکیب STX2B

علائم و اختصارات

دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو	United Nations Office at Vienna, The office for Outer Space Affairs
باکتری اشریشیاکلی انتروهموراژیک	Enterohemorhagic Escherichia coli (EHEC)
سندرم اورمی همولیتی	Heamolytic Uremic Syndrome
بی‌وزنی شبیه‌سازی شده	Simulated Microgravity
دی‌آمونیاک بنزوئیک اسید	Diaminobenzoic Acid (DAB)
اجسام توده‌ای	Inclusion bodies
نرم‌افزار آماری SSPS	Sciences Statistical Package for the Social

مقدمه

محیط زندگی موجودات زنده به‌طور مستقیم بر ویژگی‌های حیات تأثیرگذار بوده و هر گونه تغییر در شرایط آن، بر اکثر فرایندها اثر می‌گذارد. نیروی جاذبه به‌عنوان یک عامل فیزیکی پر اهمیت در محیط زیست جانداران ساکن بر کره زمین، تأثیر به سزایی در رشد، تکامل و متابولیسم آن‌ها دارد و تغییرات این نیرو همانند آنچه فضانوردان در طول سفر فضایی خود تجربه می‌کنند، منجر به تحولاتی در انواع سلول‌ها می‌شود. به عبارت دیگر، بی وزنی به عنوان یک محیط خاص و منحصر به فرد، بر بسیاری از ویژگی‌های عملکردی جانداران تأثیرات زیادی دارد. ویژگی اصلی این محیط خاص شامل رسوب‌گذاری کم، تنش برشی ناچیز و تلاطم اندک

۱. استادیار
۲. دانشجوی دکتری
۳. استاد

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

محیط است [۱]. میکروارگانیسم‌ها نیز همانند سایر جانداران، تحت تأثیر شرایط بی‌وزنی، تغییرات زیادی را متحمل می‌شوند. کاهش گرانش در میکروارگانیسم‌ها ممکن است مجموعه‌ای از تغییرات فیزیولوژیکی نظیر شرایط و سرعت رشد، مقاومت به انواع استرس‌ها از جمله آنتی بیوتیک‌ها، تغییر الگوی مصرف سوبستراها و همچنین تغییر در نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه را باعث شود [۲].

باکتری اشریشیاکلی انتروهموراژیک[۴](EHEC) سویه O157:H7 جزء باکتری‌های بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام بوده که از طریق آب و غذای آلوده به مدفوع دام، به انسان منتقل می‌شود و علاوه بر اسهال، با عوارض وخیم مرگ‌آوری چون سندرم اورمی همولیتی[۵] (HUS) همراه است. مرگ در ۳ تا ۵ درصد بیماران مبتلا به این بیماری رخ می‌دهد و عوارض شدیدی مانند نارسایی کلیه، فشار خون بالا و علائمی در سیستم مرکزی در بیش از ۳۰ درصد بیماران قابل مشاهده است [۳]. به‌منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از *E. coli*: O157:H7، مطالعات گسترده‌ای در زمینه تولید کاندید واکسن مؤثر توسط محققان در حال انجام است [۴]. سم شبه شیگا نوع ۲ (STX2) که به‌عنوان عامل بیماری‌زایی این باکتری مطرح است شامل یک زیرواحد سمی به نام STx2A و یک بخش پنج تکراری مشابه (هموپنتامریک) غیرسمی با وظیفه اتصال به گیرنده، به نام STx2B است. STx2B با اتصال به گیرنده سطح سلولی Gb3 که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود، باعث ورود بخش سمی یعنی STx2A به درون سلول می‌گردد. بنابراین STX2B از نظر ایمنی‌زایی مهم بوده و از این رو، با تولید آنتی بادی علیه آن و خنثی‌سازی سم می‌توان از اتصال و سپس ورود STx2A به درون سلول جلوگیری به عمل آورد [۵]. با توجه به ایجاد مصونیت پس از ابتلا به این بیماری، کارایی واکسن علیه پیشگیری این بیماری اثبات شده است [۶]. علاوه بر این با توجه به غیرسمی بودن زیر واحد STx2B و ایمنی زایی ذاتی آن، می‌تواند به عنوان یکی از کاندیدهای مناسب برای واکسن نوترکیب برای ایجاد ایمنی علیه این بیماری درنظر گرفته شود [۷].

تولید پروتئین‌ها به‌صورت نوترکیب انقلابی در علم بیولوژی مولکولی بوده و تقاضا برای پروتئین‌های نوترکیب با مصارف گوناگون از جمله صنعتی، پزشکی، دارو، واکسن و غیره به طور چشمگیری در حال افزایش است تا حدی که روش‌های سنتی تولید، به تنهایی جوابگوی این تقاضا برای نسل‌های حال و آینده نخواهد بود. تاکنون تعداد زیادی از پروتئین‌های نوترکیب مهم با استفاده از فناوری‌های نوین تولید شده‌اند اما محققان تلاش می‌کنند روش‌هایی برای افزایش بازده این محصولات ارائه داده و علاوه بر کاهش هزینه‌ها، کیفیت آن‌ها را نیز بهبود بخشند. در مسیر بهینه‌سازی بیان پروتئین، عواملی نظیر انتخاب میزبان مناسب، بهینه سازی شرایط رشد، انتخاب بهترین ناقل برای بیان، کنترل رونویسی و برچسب‌های تمایلی برای خالص‌سازی مورد توجه بیشتر قرار گرفته‌اند [۸].

مطالعات زیادی ثابت نموده‌اند که شرایط بی‌وزنی واقعی و بی‌وزنی شبیه‌سازی شده[۶] (SMG) باعث تغییراتی در سرعت رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین تغییرات کلی در بیان ژن، تنظیم پروتئین و انتقال متابولیت‌ها شده است [۹].

اگرچه انجام مطالعات در زمینه بی‌وزنی، در حین پرواز اولویت بیشتری دارند اما انجام تحقیقات زیستی در شرایط واقعی فضا دشوار بوده و به دلیل مشکلات زیادی که در مأموریت‌های فضایی وجود دارد مانند هزینه بالا، زمان کوتاه و محدودیت تکرارپذیری، امروزه استفاده از مدل‌های شبیه‌سازی شده بر روی زمین مورد توجه است و برای انجام مطالعات به‌طور گسترده استفاده می‌شود [۹]. با توجه به افزایش بیان برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط واقعی فضا [۱۰] و همچنین بی‌وزنی شبیه‌سازی شده [۲, ۱۰–۱۵]، محققان نتیجه‌گیری کردند که بی‌وزنی شرایطی را ایجاد می‌کند که به موجب آن انرژی سلولی به سمت تغییر بیان ژن‌های پاسخ‌گو به تنش، هدایت می‌شود. در این مسیر وقایع حفاظتی مانند بیوسنتز دیواره برای حفظ سلول و همچنین تولید ترکیباتی به‌منظور تحمل تغییرات فشار اسمزی متمرکز می‌گردد [۱۶, ۱۷]. نظر به افزایش بیان و کارایی تولید برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط بی‌وزنی و همچنین اهمیت STx2B در ایجاد ایمنی علیه بیماری ناشی از *E. coli* سویه O157:H7، در مطالعه پیش‌رو، به‌منظور بهینه‌سازی تولید این پروتئین کوچک به‌عنوان کاندید واکسن، میزان بیان آن در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده مورد بررسی و آزمون قرار گرفت.

روش بررسی

پلاسمید بیانی pET28a حاوی قطعه ژن *stx2B* نوترکیب (۲۱۰ جفت باز)، از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری دریافت و با استفاده از روش PCR، با پرایمرهای عمومی T7 حضور ژن *stx2B* تأیید شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است. پس از تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3)، با روش شیمیایی توسط کلرید کلسیم ورود پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌ها با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت. باکتری‌های واجد پلاسمید روی پلیت حاوی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. به‌منظور تهیه کشت شبانه برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب STx2B، یک کلونی به

4 . Enterohemorhagic Escherichia coli
5 . Heamolytic Uremic Syndrome
6 . Simulated Microgravity

محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد. در روز بعد ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تلقیح شد (نسبت ۱:۱۰۰). نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و هوادهی در شیکر با سرعت ۱۵۰–۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد و پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت به حدود ۰/۶ (در ۶۰۰ نانومتر) با استفاده از غلظت یک میلی مولار IPTG (ایزوپروپیل تیو بتا–دی گالاکتوزید) بیان پروتئین القاء شد. به‌منظور بررسی تأثیر مدت زمان بر میزان بیان پروتئین، توقف بیان و جمع‌آوری نمونه‌ها در زمان‌های ۲ ساعت، ۴ ساعت و یک شب پس از القاء انجام شد. رسوب سلولی نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ (۵ دقیقه/ ۵۰۰۰RPM) جمع‌آوری و بیان پروتئین با روش الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) بررسی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها

T7promoter	5'TAATACGACTCACTATAGGG3´
T7terminator	5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3´

پس از بهینه‌سازی زمان بیان، به‌منظور مقایسه میزان بیان پروتئین نوترکیب در شرایط بی‌وزنی نسبت به جاذبه طبیعی زمین (g ۱)، از کشت شبانه به محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین در سه ظرف به این شرح تلقیح شد:

۱. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱/۵ حجم محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین و شرایط هوادهی در شیکر با سرعت ۱۵۰–۱۲۰ دور در دقیقه به عنوان محیط کشت استاندارد
۲. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین فاقد حباب بدون هوادهی در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی دستگاه کلینواستت
۳. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین فاقد حباب بدون هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی

دستگاه کلینواستت به‌کاررفته در این تحقیق، از نوع تک‌محوره است که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو در اختیار پژوهشگاه هوافضا قرارگرفته بود. کلینواستت در واقع یک شبیه‌ساز بی‌وزنی است و صفحه‌ای دارد که به آرامی و با سرعتی ثابت حول محور افقی (در جهت یا خلاف جهت عقربه ساعت) می‌چرخد. به دلیل چرخش حول یک محور منفرد جهت‌دار ۹۰ درجه نسبت به بردار جاذبه زمین، جهت بردار جاذبه بر روی نمونه قرار گرفته بر روی آن، به‌صورت ریتمیک تغییر می‌کند و از این رو میانگین بردار جاذبه بسیار به صفر نزدیک می‌شود. در واقع هر قدر نمونه‌های قرار گرفته بر روی این دستگاه به مرکز نزدیک‌تر باشند میزان خطا کمتر خواهد بود. کاربرد واژه میکروگراویتی در مطالعات به این حقیقت اشاره دارد که نیروی گرانش، کاملاً برابر صفر نبوده بلکه بسیار کوچک و نزدیک به صفر می‌باشند [۱۸ و ۹]. در این پژوهش بر اساس فاصله مرکز فالکون‌ها از مرکز کلینواستت (۲ سانتیمتر) و سرعت چرخش دستگاه که بر روی ۱۵ دور در دقیقه در جهت چرخش عقربه ساعت تنظیم شده بود شتاب جاذبه g ۰/۰۰۵ محاسبه شد [۱۹].

کلیه آزمایش‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد و در سه تکرار انجام شد. در پایان پس از جمع‌آوری باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (۵ دقیقه/ ۵۰۰۰RPM)، بررسی نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد [۲۰].

با توجه به بیان بالای پروتئین بیانی، بررسی حضور آن به‌صورت محلول یا نامحلول در فرم اجسام توده‌ای (Inclusion bodies) بررسی شد. به این منظور ابتدا رسوب سلولی حاصل از القای بیان پروتئین، در بافر لیزکننده (NaH2PO4، NaCl، Imidazole) همگن شد. سپس توسط سونیکاسیون دو بار هر بار به مدت ۲ دقیقه و با قدرت خروجی ۱۰۰٪، دیواره‌های سلولی شکسته‌شده و پس از سانتریفیوژ، رسوب و محلول رویی جدا شد. محلول رویی حاوی پروتئین‌های محلول (تحت عنوان فاز محلول) و رسوب، حاوی پروتئین به فرم نامحلول به همراه بقایای سلولی است. رسوب حاصله را در بافری حاوی اوره (NaH2PO4، Tris-HCl، اوره ۸ مولار) حل کرده و پس از سونیکاسیون مانند مرحله قبل، به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در انتها، پس از سانتریفیوژ، پروتئین‌های نامحلول در محلول رویی (تحت عنوان فاز نامحلول) قرار گرفته و بقایای سلولی در رسوب باقی ماند. بررسی تمام نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد [۲۰].
به دلیل قرارگیری نشانه ۶His-tag در ابتدای ژن *stx2B*، به منظور تخلیص این پروتئین نوترکیب، از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (کیاژن) استفاده شد. تخلیص پروتئین‌های نوترکیب موجود در هر یک از فازهای محلول و نامحلول از مرحله قبل، به صورت مجزا توسط ستون نیکل و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در هر مرحله خروجی ستون (E: Elution) به‌صورت جداگانه جمع‌آوری شد [۲۱]. برای بررسی روند تخلیص پروتئین، روش SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور تأیید بیان پروتئین نوترکیب، از روش وسترن بلاتینگ استفاده شد. در این آزمون از آنتی‌بادی بر علیه دنباله هیستیدین (Anti His tag) متصل شده به HRP به‌عنوان آنتی بادی برای ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد. تمامی نمونه‌های مورد آزمایش به اضافه کنترل منفی آزمون (محیط کشت حاوی باکتری ولی بدون القاء)

توسط SDS-PAGE به‌طور کامل از یکدیگر تفکیک شده و سپس به غشای PVDF منتقل شد. پس از شستشوی غشا و قرارگیری در بافر مسدودکننده حاوی شیر خشک بدون چربی، Anti His tag جهت ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد. به‌منظور آشکارسازی از قرص‌های DAB به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده شد [۲۲].

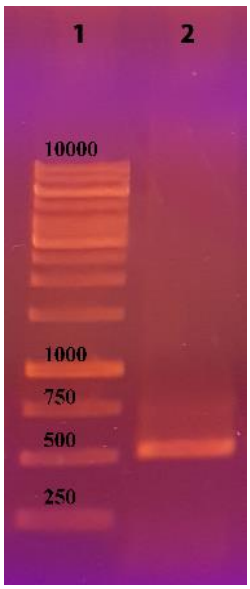
در مرحله بعد، برای تعیین غلظت پروتئین نوترکیب، با استفاده از BSA (سرم آلبومین گاوی: سیناژن) به‌عنوان استاندارد، منحنی استاندارد به روش برادفورد ترسیم شد و سپس غلظت پروتئین تخلیص شده در مقایسه با نمودار تعیین شد [۲۰].

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

در انتها نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 ترسیم شدند و از نرم‌افزار آماری SPSS، برای مقایسه میزان بیان پروتئین‌ها در شرایط مختلف بررسی شد. مقدار $p\text{-}value \leq 0.05$ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها درنظرگرفته شد.

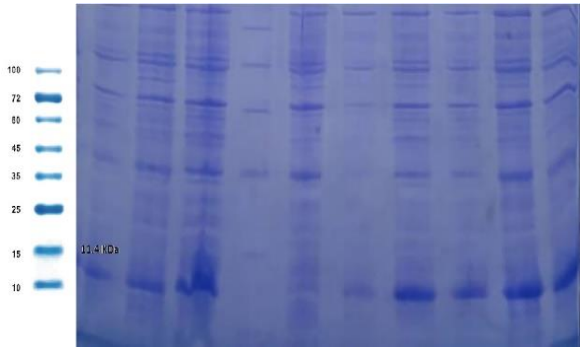
یافته‌ها

با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد محصول اختصاصی مربوط به تکثیر ژن *stx2B* تکثیر شده با روش PCR، تأیید شد. با توجه به اینکه از پرایمرهای عمومی T7 جهت تکثیر ژن *stx2B* استفاده شد به اندازه تقریبی ۱۵۰bp به ابتدا و ۱۵۰bp به انتهای ژن اضافه شده است. بنابراین به طور تقریبی ۳۰۰ جفت باز به قطعه ژنی اضافه شده و مشاهده باند حدودی ۵۰۰ جفت باز بر اساس مارکر مولکولی، مؤید تکثیر ژن *stx2B* بود (شکل ۱).



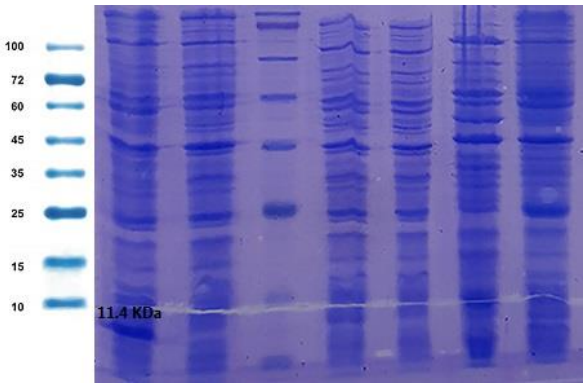
شکل ۱- تأیید حضور سازه ژنی stx2B با روش PCR. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی وزن مولکولی، ستون ۲: محصول تکثیر ژن با پرایمرهای عمومی T7

بیان پروتئین نوترکیب در ساعات مختلف پس از القاء با IPTG انجام پذیرفت. با توجه به اینکه وزن مولکولی پروتیئن نوترکیب حدود ۱۱/۴ کیلو دالتون است، از ژل پلی‌آکریل‌آمید با غلظت ۱۲ درصد استفاده و مشاهده شد که بالاترین میزان بیان پروتئین نوترکیب STx2B، پس از یک شب بعد از القاء صورت پذیرفته است (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی و بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب STx2B در زمان‌های مختلف بر روی چند کلونی باکتریائی. ستون‌های ۳-۱: بیان ۲ ساعت پس از القاء، ستون ۴. نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۵: کنترل منفی حاوی ژن بدون القاء با IPTG، ستون‌های ۶-۸. : بیان ۴ ساعت پس از القاء، ستون‌های ۹ و ۱۰: بیان یک شب پس از القاء

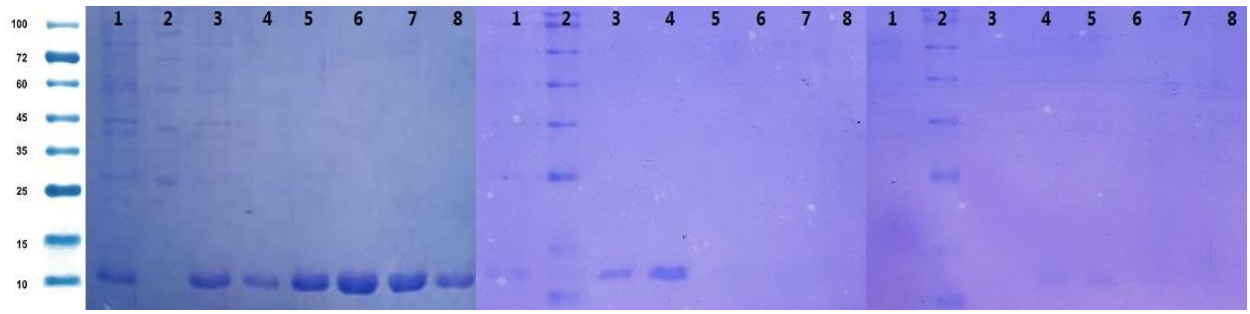
پس از بهینه‌سازی زمان، بررسی بیان پروتئین در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده انجام شد. میزان بیان در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده نسبت به جاذبه طبیعی زمین، به کمک روش SDS-PAGE جاذبه طبیعی مقایسه شد (شکل ۳). نتایج نشان داد که بیان پروتئین نوترکیب در فالکون نیمه پر در شرایط جاذبه طبیعی به دلیل هوادهی، بیشتر از بقیه حالات بود.



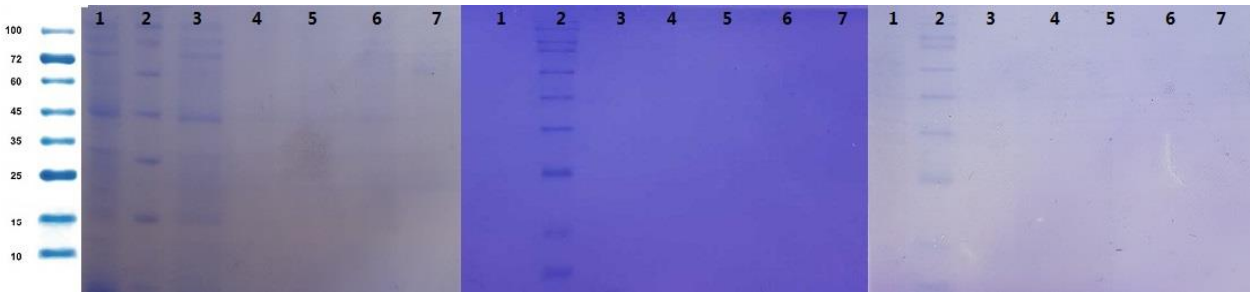
شکل ۳- بیان پروتئین STX2B در شرایط مختلف به مدت یک شب. ستون ۱: القاء بیان درون فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۲: کنترل منفی بیان درون فالکون پر بدون القاء با IPTG، ستون ۳: مارکر پروتئین ، ستون ۴: بیان درون فالکون پر در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده، ستون ۵: کنترل منفی بیان درون فالکون پر در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده بدون القاء با IPTG، ستون ۶: بیان درون فالکون همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی ، ستون ۷: کنترل منفی بیان درون فالکون همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی بدون القاء با IPTG

به‌منظور دست‌یابی به مقادیر کمّی پروتئین نوترکیب بیان‌شده STx2B در هر یک از حالت‌های محلول یا نامحلول، پس از تخلیص توسط کروماتوگرافی میل جذبی با استفاده از ستون NI-NTA، نمونه‌های خروجی از ستون جمع‌آوری شده و ابتدا بر روی ژل SDS-PAGEبررسی شدند (شکل‌های ۴ و ۵).

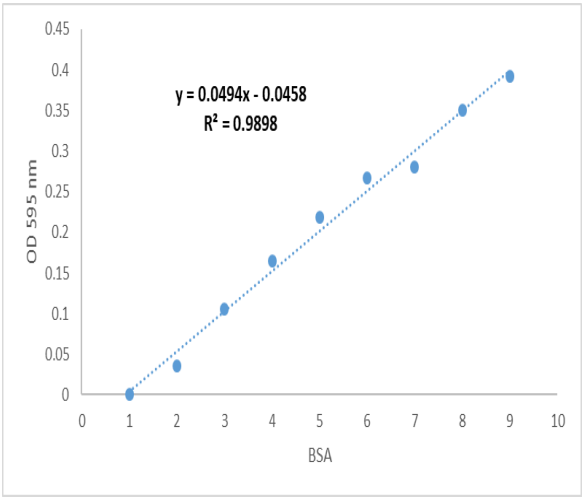
سپس جذب نوری نمونه‌ها با روش برادفورد تعیین و غلظت‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد ترسیم شده توسط BSA (شکل ۶)، تعیین شدند (جدول ۱).



شکل ۴- خالص سازی پروتئین نوترکیب در فاز نامحلول. A. فالکون همراه با هوادهی و شرایط جاذبه طبیعی، B. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی و C. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط بی وزنی (ستون‌ها به ترتیب شامل ۱: محلول عبوری از ستون، ۲: مارکر پروتئین، ۳: شستشو، ۴ تا ۸: مراحل خالص سازی).



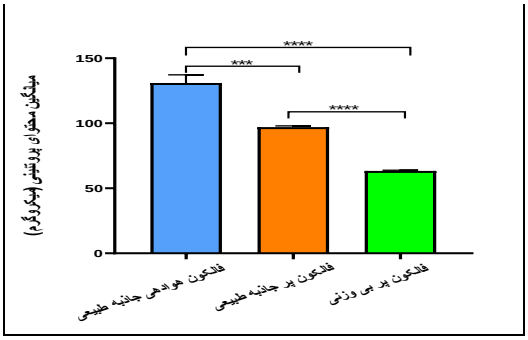
شکل ۵- خالص سازی پروتئین نوترکیب در فاز محلول. A. فالکون همراه با هوادهی و شرایط جاذبه طبیعی، B. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی و C. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط بی وزنی (ستون‌ها به ترتیب شامل ۱: محلول عبوری از ستون، ۲: مارکر پروتئین، ۳: شستشو، ۴ تا ۷: مراحل خالص سازی).



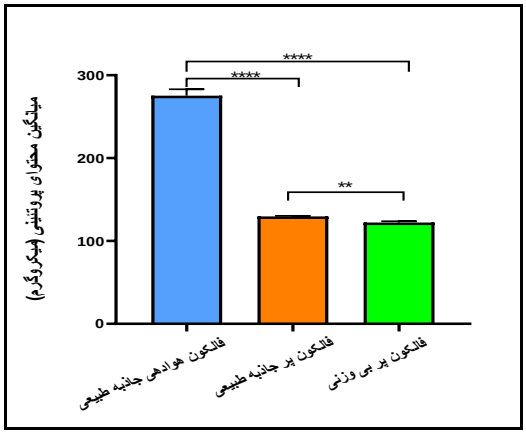
شکل ۶- منحنی استاندارد برادفورد ترسیم شده توسط غلظت‌های مختلف BSA

جدول ۲- میانگین محتوای پروتئینی (میکروگرم/میلی لیتر) بیان شده در شرایط مختلف

شرایط نمونه	فاز	میانگین محتوای پروتئین	انحراف معیار
فالکون حاوی محیط کشت همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی	محلول	۱۳۱	۶/۲۸
	نامحلول	۲۷۵	۷/۹۶
فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی	محلول	۹۷	۱/۰۱
	نامحلول	۱۲۹	۰/۳۷
فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده	محلول	۶۳	۰/۱۹
	نامحلول	۱۲۲	۱/۵۶

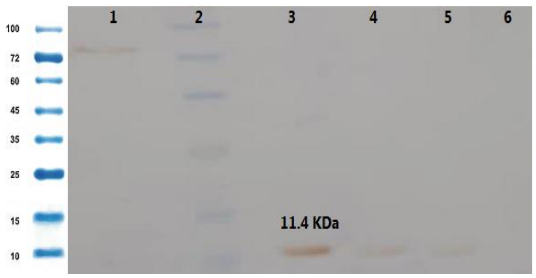


شکل ۷- پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نوترکیب تخلیص شده با روش محلول (Native) در شرایط مختلف، اختلاف معنی دار نشان داد ($P\leq0.05$, Mann-Whitney U test).
(****): *p-value* is less than 0.0001,(***): *p-value* is less than 0.001).



شکل ۸- پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نوترکیب تخلیص شده با روش نامحلول (Denature) در شرایط مختلف، اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P\leq0.05$, Mann-Whitney U test).
(****): *p-value* is less than 0.0001,(**): *p-value* is less than 0.01).

پروتئین نوترکیب بیان شده با توجه به دنباله هیستیدینی متصل به آن، از طریق روش وسترن بلاتینگ با آنتی بادی بر علیه His-tag و مشاهده باندهای مورد نظر شده بر روی غشا PVDF، تائید شد (شکل ۹).



شکل ۹- تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلاتینگ. ستون ۱: کنترل مثبت (پروتئین حاوی دنباله هیستیدینی)، ستون ۲: مارکر وزن مولکولی، ستون ۳: فالکون نیمه پر با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۴: فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۵: فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، ستون ۶: .کنترل منفی (نمونه بدون القا).

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین‌ها به‌عنوان اصلی‌ترین مولکول‌های حیات، تقریباً در تمامی فرایندهای زیستی موجودات زنده دخالت دارند. در سال‌های اخیر علوم بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین، به عنوان ابزاری نوین به ساخت تجاری پروتئین‌ها به‌صورت نوترکیب جهت کاربردهای صنعتی، کشاورزی، پزشکی، دارویی و واکسن کمک نموده است. از معضلاتی که ممکن است حین تلاش برای دستیابی به حداکثر مقدار پروتئین نوترکیب به‌وجود آید نامحلول‌شدن پروتئین بیان شده و تشکیل اجسام توده‌ای در سیتوپلاسم باکتری به دلیل تاخوردگی نامناسب است. رفع این مشکل از نظر بیوتکنولوژی اهمیت به سزایی دارد و در همین مسیر روش‌های متعددی برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و دستیابی به پروتئین محلول وجود دارد که شامل تغییر در عواملی نظیر درجه حرارت، تنظیم میزان بیان، کاهش متابولیسم میزبان و غلظت ماده القاء کننده یا تغییرات مهندسی روی پروتئین هدف مانند اتصال دنباله مناسب به پروتئین و نیز بیان همزمان چاپرون‌هائی است که تاخوردگی مناسب پروتئین را افزایش می‌دهند. همچنین اگر علت نامحلول بودن پروتئین، بیان بیش از حد آن باشد می توان با کاهش دادن سطح بیان پروتئین به این مشکل غلبه نمود. از میان روش‌های ذکر شده، مهمترین عمل، تغییر شرایط رشد باکتری است زیرا مشخص شده است که تغییر شرایط رشد مانند تغییرات دما، تراکم اولیه کشت و طول مرحله بیان، می‌تواند میزان بیان پروتئین محلول را با تغییر تاخوردگی آن تغییر دهد [۲۳]. علاوه بر این ثابت شده است که رشد و القاء سلول‌ها تحت شوک حرارتی و کنترل استرس اسمزی، حلالیت برخی از پروتئین‌های نوترکیب را افزایش می‌دهد [۲۴]. با این حال هنوز محدودیت‌هایی برای ارتقاء بیشتر تولید پروتئین وجود دارد.

شرایط بی‌وزنی به دلیل تغییرات جاذبه، انتقال جرم و تأمین مواد مغذی برای پاسخ سلولی و در نتیجه تغییرات فیزیکوشیمیایی، به عنوان یک شرایط خاص و منحصر به فرد درنظرگرفته می‌شود و مطالعات چندی نشان داده اند که شرایط بی وزنی، باعث افزایش تولید برخی پروتئین‌های نوترکیب شده است [۲]. مطالعات گسترده ژنومی و پروتئومی انجام پذیرفته توسط هوانگفو و همکاران که به بررسی علل افزایش بیان پروتئین نوترکیب بتاگلوکورونیداز در شرایط SMG پرداخته اند نشان داده که ژن‌های مربوط به ریبوزوم و RNA پلی مراز که مستقیماً با افزایش بیان پروتئین‌ها ارتباط دارند، در این شرایط افزایش بیان داشته‌اند. همچنین ثابت شده است که تاخوردن مؤثر پروتئین‌ها پس از ترجمه، گردهمایی پلی‌پپتیدها به صورت ساختارهای الیگومریک و استقرار پروتئین‌ها، به واسطه پروتئین‌های اختصاصی به نام چاپرون‌های مولکولی امکان‌پذیر است. چاپرون‌ها دسته دیگری از

پروتئین‌هایی هستند که در سطح پروتئومی در شرایط SMG افزایش بیان را نشان داده‌اند. درک چگونگی تأثیر SMG بر ترجمه و تاخوردگی پروتئین می‌تواند برای کشف پتانسیل‌های جدید به‌منظور افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب سودمند باشد [۲ و ۸].

مطالعه بر روی شیوع و گسترش باکتری *E.coli O157:H7* به عنوان مهم‌ترین سروتیپ اشریشیا کلای خونریزی‌دهنده روده‌ای در ایجاد بیماری شدید دستگاه گوارش از جمله اسهال خونی، بیماری‌های سیستمیک مانند سندرم اورمی همولیتیک، در حفظ سلامت عمومی حائز اهمیت است. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی بیوتیکی در عفونت ایجاد شده توسط این باکتری، در حال حاضر واکسیناسیون یکی از مهم‌ترین روش‌های امیدبخش برای کنترل آن است. امروزه با گسترش علم زیست فناوری می‌توان فاکتورهای اصلی ایجادکننده بیماری و همچنین محرک پاسخ‌های ایمنی را در غالب پروتئین‌های نوترکیب تهیه کرد و از آن‌ها به عنوان کاندیدای واکسن علیه انواع پاتوژن‌ها به جای واکسن‌های سنتی استفاده کرد [۲۵, ۲۶].

با توجه به عملکرد پروتئین STx2B جهت اتصال سم شبه شیگا به سلول میزبان و قابلیت ایجاد پاسخ ایمنی کارامد علیه باکتری *E.coli* O157:H7 توسط این پروتئین، بهینه‌سازی و افزایش میزان بیان این پروتئین نوترکیب برای استفاده در واکسن‌های مختلف در دستور کار تحقیقات قرار گرفت. این زیر واحد پروتئینی، با اتصال به گیرنده‌های سطح سلول‌های هدف، می‌تواند به خوبی در دسترس سیستم ایمنی قرار گیرد و با توجه به ترادف اسیدهای آمینه آن، موجب تحریک پاسخ ایمنی هومورال در میزبان شود [۲۷]. با توجه به نیاز به مقادیر بالای پروتئین نوترکیب با کیفیت مناسب در تولید واکسن و نظر به وجود شواهدی مبنی بر افزایش بیان برخی از پروتئین‌های نوترکیب درشرایط بی‌وزنی نسبت به شرایط جاذبه طبیعی [۲]، در این پژوهش بیان پروتئین نوترکیب STx2B در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده مورد بررسی و سنجش قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، پس از بهینه‌سازی زمان بیان پروتئین نوترکیب STx2B و تأیید ابتدایی از طریق دنباله هیستیدینی توسط آنتی بادی His-tag، بیان آن در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده القاء شد و پس از تخلیص با هر دو روش محلول و نامحلول توسط ستون کروماتوگرافی Ni-NTA و تأیید نهایی، میزان آن مورد سنجش قرار گرفت. *E. coli* به‌عنوان میزبان تولیدکننده، یک باکتری هوازی- بی‌هوازی اختیاری بوده و در هر دو شرایط حضور یا عدم حضور اکسیژن قادر به ادامه حیات می‌باشد و از انرژی حاصل از شکستن قند برای فرایندهای حیاتی خود استفاده می‌کند. میزان انرژی آزاد شده از یک مولکول گلوکز در زمان در دسترس بودن اکسیژن، بسیار بالاتر و در حدود ۱۸ برابر است [۲۸]. با توجه به صرف انرژی بسیار بالا جهت بیان پروتئین توسط باکتری، میزان اکسیژن در دسترس فاکتوری تاثیر گذار در بازده بیان پروتئین است. در این شرایط با قرار دادن باکتری در ظرف حاوی محیط کشت با درب نفوذ پذیر و در انکوباتور شیکر دار، بیان بالاتر حاصل می‌گردد. در این مطالعه ما برای شبیه سازی شرایط بی وزنی، از دستگاه کلینواستت تک محوره استفاده نمودیم که به دلیل چرخش دستگاه، امکان باز بودن درب ظرف وجود نداشته و به علاوه جهت غلبه بر نیروی تنش برشی به منظور برقراری شرایط بی وزنی، ظرف محیط کشت باید فاقد هر گونه فضای خالی (حباب) باشد. به این صورت، عملاً هوادهی انجام نخواهد شد و پس از گذشت زمان، تمامی اکسیژن محلول در محیط کشت به اتمام رسیده و باکتری برای تامین انرژی مورد نیاز خود، قند محیط را از مسیر گلیکولیز تجزیه نموده که بازده اندکی دارد. علاوه بر آن متابولیت‌های ناشی از تجزیه گلوکز در شرایط بی هوازی منجر به تولید ترکیباتی می‌شوند که ممکن است بر رشد باکتری تاثیر منفی بگذارد. مطابق با اطلاعات، بیان پروتئین در شرایط بدون هوادهی، باید بسیار کم باشد اما نتایج کار نشان داد که در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، هنوز شاهد مقادیر قابل توجه پروتئین نوترکیب STx2B (به ترتیب ۴۸٪ و ۴۴٪ در شرایط محلول و نامحلول نسبت به میزان بیان در شرایط جاذبه طبیعی همراه با هوادهی) بودیم. بدیهی است این میزان بیان، در صورت اکسیژن‌رسانی به میزان چشمگیری افزایش خواهد داشت. در مقایسه کلی، هم در شرایط بی‌وزنی و هم جاذبه طبیعی، بیان پروتئین در حالت نامحلول بیشتر از حالت محلول بوده است. علاوه بر این در شرایط واقعی فضا، با وجود برقراری بی‌وزنی، محیط فاقد اکسیژن نخواهد بود و در آن صورت تنفس هوازی انجام شده و بنابراین می‌توان انتظار داشت که بیان پروتئین مقدار بالایی خواهد بود. در مطالعه‌ای که توسط هوانگفو و همکاران انجام پذیرفته است ثابت شده است که بیان پروتئین نوترکیب بتا-گلوکوزیداز در میزبان *E. coli* در شرایط بی‌وزنی در دستگاه شبیه‌ساز[۷] HARV که امکان تبادل گازها وجود دارد، تا میزان ۵۲ درصد نسبت به شرایط جاذبه طبیعی افزایش بیان داشته است [۲]. همچنین Qi و همکاران نیز در پژوهشی بیان پروتئین نوترکیب بتا-گلوکوزیداز در میزبان *P. pastoris* در شرایط بی‌وزنی در دستگاه شبیه‌ساز[۸] LSMMG را که در آن نیز امکان تبادل گازی وجود دارد، بررسی کردند. نتایج نشان دادند که بیان پروتئین مذکور تا حدود ۲/۲۱ برابر نسبت به شرایط جاذبه طبیعی افزایش یافت [۱۲]. بنابراین با برقراری شرایط جهت تبادلات گازی و همچنین تغییر میزبان می‌توان به بررسی اثر یک جانبه شرایط بی‌وزنی بر میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب پرداخت [۲۹] .

7. High-aspect Rotating-Wall Vessel

8. Low Shear Modeled Microgravity

با توجه به مقدار PI پروتئین STx2B (۵/۱۸)، به نظر می‌رسد در محیط کشت LB با pH=۷ ، پروتئین مورد نظر ما بار منفی داشته و ویژگی اسیدی دارد. نظر به اینکه هر قدر تفاوت pH محیط کشت با pI پروتئین بیشتر باشد، ممکن است تجمع توده‌های غیرفعال پروتئینی بیشتر شده و در نتیجه مقدار پروتئین مناسب و کاربردی کاهش یابد، احتمال دارد با تنظیم مداوم pH محیط کشت بیانی به حدود pI پروتئین STx2B، بتوان به میزان بالاتری از پروتئین نوترکیب با حلالیت بالاتر دست یافت. البته مشخص شده است که کاهش pH می‌تواند بر روی رشد باکتری میزبان نیز اثرگذار باشد. علاوه بر این با افزایش میزان مواد مغذی موجود در محیط کشت یا حتی تغییر کامل نوع محیط کشت، بیان برخی پروتئین‌های نوترکیب افزایش می‌یابد و همچنین عامل تأثیرگذار دیگر در این زمینه، زمان مناسب القاء است چرا که بازدهی تولید پروتئین نوترکیب تابع رشد میکروارگانیسم است که پس از القاء صورت می‌گیرد [۲۹]. لذا با عنایت به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، مشخص شد که شرایط نبود جاذبه به عنوان یک محیط با شرایط خاص، جهت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب قابل ارزیابی و بررسی‌های گسترده‌تر است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و پژوهشگاه هوافضا جهت انجام آزمایش‌ها قدردانی می‌شود. منابع مالی این پژوهش توسط محققان تأمین شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

مراجع

[1] C.A. Nickerson, and et al., "Microbial responses to microgravity and other low-shear environments." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68, no. 2, p. 345-361, 2004.

[2] J. Huangfu, and et al., "*Omics analysis reveals the mechanism of enhanced recombinant protein production under simulated microgravity." Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 8, p. 30, 2020.

[3] P.R. Murray, and K.S. Rosenthal, *Review of medical microbiology*, Elsevier Health Sciences. 2005.

[4] M. Rojas-Lopez, and et al., "Intestinal pathogenic Escherichia coli: Insights for vaccine development." *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 440, 2018.

[5] N. Engedal, and et al., "Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging." *Microbial biotechnology*, vol. 4, no. 1, p. 32-46, 2011.

[6] D.R. Sizemore, K.L. Roland, and U.S. Ryan, "Enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors and vaccine approaches." *Expert review of vaccines*, vol. 3, no. 5, p. 585-595, 2004.

[7] J. Sánchez, and J. Holmgren, "Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea." *Current opinion in immunology*, vol. 17, no. 4, pp. 388-398, 2005.

[8] P. Saeedi, and et al., "Advances and challenges in recombinant protein expression in Escherichia coli." *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, vol. 9, no. 36, pp. 9-42, 2019.

[9] B. Huang, and et al., "Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism." *Military Medical Research*,. vol. 5, no. 1, pp. 1-14, 2018.

[10] Y. Huang, and et al., "Enhanced S-adenosyl-l-methionine production in Saccharomyces cerevisiae by spaceflight culture, overexpressing methionine adenosyltransferase and optimizing cultivation." *Journal of applied microbiology*, vol. 112, no. 4, pp. 683-694, 2012.

[11] L. Xiang, and et al., "Simulated microgravity affects growth of Escherichia coli and recombinant β-D-glucuronidase production." *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 162, no. 3, p. 654-661, 2010.

[12] F. Qi, and et al., "Enhancement of recombinant β-D-glucuronidase production under low-shear modeled microgravity in Pichia pastoris." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2011. vol. 86, no. 4, 2011, pp. 505-511.

[13] J. Huangfu, and et al., "Novel helper factors influencing recombinant protein production in Pichia pastoris based on proteomic analysis under simulated microgravity." A*pplied microbiology and biotechnology*, vol. 99, no. 2, pp. 653-665, 2015.

[14] S. Navran, *Rotary bioreactor for recombinant protein production*, in *Cell Technology for Cell Products*, Springer, pp. 567-569, 2007.

[15] M.A. Saarinen, and D.W. Murhammer, "Culture in the rotating-wall vessel affects recombinant protein production capability of two insect cell lines in different manners." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, vol. 36, no. 6, pp. 362-366, 2000.

[16] R., G Willaert, "The growth behavior of the model eukaryotic yeast Saccharomyces cerevisiae in microgravity." *Current Biotechnology*, vol. 2, no. 3, pp. 226-234, 2013.

[17] G. Senatore, and et al., "Effect of microgravity & space radiation on microbes." *Future microbiology*, vol. 13, no. 07, pp. 831-847, 2018.

[18] Z. Gitai, and L. Shapiro, "Bacterial cell division spirals into control." *Proceedings of the National Academy of Sciences.* vol. 100, no. 13, pp. 7423-7424, 2003.

[19] United Nations., Teacher's Guide to Plant Experiments in Microgravity. *Human Space Technology Initiative*, 2013.

[20] D. Bollag, D. Michael, and J. Stuart, *Protein methods*, 2nd Ed. A John Willey and Sons. Inc. Pub., New York, 1996.

[21] P.T. Wingfield, I. Palmer, and S.M. "Liang, Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from Escherichia coli." *Current protocols in protein science*, vol. 1, p. 6.5,1995.

[22] D.W. Carr, and J.D. Scott, *Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions.* Trends in biochemical sciences,. vol. 17, no. 7, pp. 246-249, 1992.

[23] T. San-Miguel, P. Pérez-Bermúdez, and I. Gavidia, *Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in E. coli is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature*. Springerplus, vol. 2, no. 1, pp. 1-4, 2013.

[24] R.G. Harrison, and M.J. Bagajewicz, *"Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli." Insoluble Proteins*, p. 403-408, 2015.

[25] V.A. Garcia-Angulo, A. Kalita, and A.G. Torres, "Advances in the development of enterohemorrhagic Escherichia coli vaccines using murine models of infection." *Vaccine*, vol. 31, no. 32, pp. 3229-3235, 2013.

[26] M.P. Stevens and et al., "Options for the control of enterohaemorrhagic Escherichia coli in ruminants." *Microbiology*, vol. 148, no. 12, pp. 3767-3778, 2002.

[27] R. Kazemi, and et al., "*Cloning and expression of the binding subunit of shiga-like toxin type 2 gene and immunization study in an animal model." Pathobiology Research*, vol.18, no. 4, p. 45-60. 2016.

[28] Nelson, D., Lehninger principles of biochemistry *Macmillan*, Lehninger principles of biochemistry: Macmillan, 2008.

[29] B. Muntari, and et al., "*Recombinant bromelain production in Escherichia coli: process optimization in shake flask culture by response surface methodology." AMB express*, vol. 2, no. 1, p.p. 1-9, 2012.