



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

Maryam Salavatifar^{1*} , Niloofar Mosallaei² and Ali Hatef Salmanian³ 

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 \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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>.



بیان هترولوگ سم شبه شیگا نوع ۲ در شرایط میکروگراویتی

مریم صلواتی فر^{۱*} ، نیلوفر مصلایی^۲ و علی هاتف سلمانیان^۳

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

۲. دانشکده 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

جادبه نیروی تأثیرگذار بر جانداران ساکن کره زمین از جمله میکروگراویتیسم‌هاست. باکتری *E. coli* O157:H7 عوارضی مانند اسهال خونی و ستلردم اورومی همولیتیک را در انسان ایجاد نموده و این سازی اصلی ترین راه مبارزه با آن است. زیر واحد B سم شبه شیگا نوع ۲ (STX2B) که عامل اتصال سم باکتری به سلول‌های هلف است، از کاندیدهای واکسن نوترکیب پیشگیری از بیماری است. نظر به افزایش کمی و کیفی بیان برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط بی‌وزنی، میزان بیان پروتئین نوترکیب STX2B در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی دستگاه کلینیکی است مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأثیر 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. تتابع یافت شده نشان دادند که به رغم کاهش میزان بیان در شرایط بی‌وزنی که احتمالاً به دلیل عدم هواهی مناسب محیط کشته بوده است، هم چنان پروتئین نوترکیب در شرایط بی‌وزنی تولید شد.

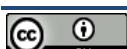
واژه‌های کلیدی: بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، باکتری *E. coli* O157:H7، ستلردم اورومی همولیتیک، پروتئین نوترکیب STX2B

مقدمه

محیط زندگی موجودات زنده به طور مستقیم بر ویژگی‌های حیات تأثیرگذار بوده و هر گونه تغییر در شرایط آن، بر اکثر فرایندها اثر می‌گذارد. نیروی جاذبه به عنوان 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، بی‌وزنی 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

علامه 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	Enterohemoragic Escherichia coli (EHEC)
ستدرم اورومی همولیتی	Haemolytic 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



آنها را نیز بهبود بخشنده. در مسیر بهینه‌سازی بیان پروتئین، عواملی نظیر انتخاب میزبان مناسب، بهینه سازی شرایط رشد، انتخاب بهترین ناقل برای بیان، کنترل رونویسی و بررسی‌های تمايلی برای خالص‌سازی مورد توجه بيشتر 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 تکارا پذیری، امروزه استفاده از مدل‌های شبیه‌سازی شده بر روی زمین مورد توجه است و برای انجام مطالعات به طور گسترده استفاده می‌شود [۹]. با توجه به افزایش بیان برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط واقعی فضا [۱۰] و همچنین بی‌وزنی شبیه‌سازی شده [۲، ۱۵-۱۰]، 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 بیوسنتر دیواره برای حفظ سلول و همچنین تولید ترکیباتی به منظور تحمل تغییرات فشار اسمزی متتمرکز می‌گردد [۱۷، ۱۶]. نظر به افزایش بیان و کارایی تولید برخی STx2B پروتئین‌های نوترکیب در شرایط بی‌وزنی و همچنین اهمیت O157:H7 سویه E. coli در ایجاد اینمی‌علیه بیماری ناشی از STx2A، در مطالعه پیش‌رو، به منظور بهینه‌سازی تولید این پروتئین کوچک به عنوان 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 تهییه سلول‌های مستعد E. coli سویه DE3، با روش شیمیایی توسط کلرید کلسیم ورود پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌ها با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت. باکتری‌های واحد پلاسمید روی پلیت حاوی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. به منظور تهیه کشت شبانه برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب STx2B یک کلونی به

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 آنتی‌بیوتیک‌ها، تغییر الگوی مصرف سوبستراها و همچنین تغییر در نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه را باعث شود [۲].

باکتری اشريشياکلي انتروهموراژيك^۴ (EHEC) سویه O157:H7 جزء باکتری‌های بیماری‌زا در مشترک بین انسان و دام بوده که از طریق آب و غذای آلدود به مدفوع دام، به انسان منتقل می‌شود و علاوه بر اسهال، با عوارض وخیم مرگ‌آوری چون سندروم 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]. به منظور 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 و اکسن مؤثر STX2 که به عنوان عامل بیماری‌زا این باکتری مطرح است شامل یک زیروحد سمی به نام STx2A و یک بخش پنج تکراری مشابه (هموپنتامریک) غیرسمی با وظیفه اتصال به گیرنده Gb3 به نام STx2B است. STx2B با اتصال به گیرنده سطح سلولی که روی اکثر سلول‌های بدن بیان می‌شود، باعث ورود بخش سمی STx2A به درون سلول می‌گردد. بنابراین این نظر ایمنی‌زا ایمه بوده و از این رو، با تولید آنتی‌بادی علیه آن و خشی‌سازی سم می‌توان از اتصال و سپس ورود STx2A به درون سلول جلوگیری به عمل آورد [۵]. با توجه به ایجاد مصنونیت 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 ایمنی‌زا ذاتی آن، می‌تواند به عنوان یکی از کاندیدهای مناسب برای واکسن نوترکیب برای ایجاد ایمنی علیه این بیماری در نظر گرفته شود [۷].

تولید پروتئین‌ها به صورت 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 تنها یک جوابگوی این تقاضا برای نسل‌های حال و آینده تخواهد 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

4 . Enterohemoragic Escherichia coli

5 . Hemolytic Uremic Syndrome

جادبه 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 می‌باشد [۱۸ و ۹]. در این پژوهش بر اساس فاصله مرکز فالکون‌ها از مرکز کلینوواست (۲ سانتیمتر) و سرعت چرخش دستگاه که بر روی ۱۵ دور در دقیقه چرخش عقریه 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 / ۵۰۰۰ RPM)، بررسی نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد [۲۰].

با توجه به بیان بالای پروتئین بیانی، بررسی حضور آن به صورت 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 شکسته شده 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 (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 انتهای، 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 His-tag در ابتدای *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) به صورت جداگانه جمع‌آوری شد [۲۱]. برای بررسی روند تخلیص پروتئین، روش SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

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

محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کاناماکسین تلقیح شد. در روز بعد ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کاناماکسین (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 ۶/۰۰ (در ۶۰۰ نانومتر) با استفاده از گل‌اکتوزید (IPTG) (ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاکتوزید) بیان پروتئین القاء شد. به منظور 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 / ۵۰۰۰ RPM) جمع‌آوری و بیان پروتئین با روش الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) بررسی شد.

جدول ۱ - توالی پرایمرهای

T7promoter	5' TAATACGACTCACTATAAGGG3'
T7terminator	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'

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

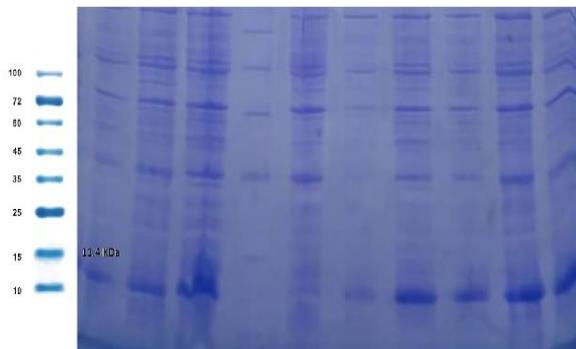
۱. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱/۵ حجم محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کاناماکسین و شرایط هواده‌ی در شیکر با سرعت ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه به عنوان محیط کشت استاندارد

۲. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کاناماکسین فاقد حباب بدون هواده‌ی در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی دستگاه کلینوواست

۳. فالکون ۵۰ میلی‌لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کاناماکسین فاقد حباب بدون هواده‌ی در شرایط جاذبه طبیعی

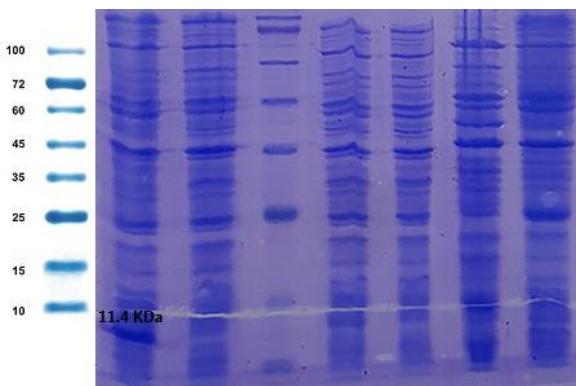
دستگاه کلینوواست به کاررفته در این تحقیق، از نوع تک محوره است که از دفتر سازمان ملل متعدد در امور فضای خارج از جو در اختیار پژوهشگاه هواشناسی قرار گرفته بود. کلینوواست در واقع یک شبیه‌ساز بی‌وزنی است و صفحه‌ای دارد که به آرامی و با سرعتی ثابت حول محور افقی (در جهت یا خلاف جهت چرخش ۹۰ درجه) می‌چرخد. به دلیل چرخش حول یک محور منفرد جهت دار نسبت به بردار جاذبه زمین، جهت بردار جاذبه بر روی نمونه قرار گرفته بر روی آن، به صورت ریتمیک تغییر می‌کند و از این رو میانگین بردار

بيان پروتئين نوترکيب در ساعات مختلف پس از القاء با IPTG انجام پذيرفت. با توجه به اينكه وزن مولکولي پروتئين نوترکيب حدود ۱۱/۴ کيلو دالتون است، از ۷ لپل آكريل أميد با غلظت ۱۲ درصد استفاده و مشاهده شد که بالاترین ميزان بيان پروتئين نوترکيب STx2B، پس از يك شب بعد از القاء صورت پذيرفته است (شكل ۲).



شكل ۲- بررسی و بهينه‌سازی بيان پروتئين نوترکيب STx2B در زمان‌های مختلف بر روی چند کلونی باکتریائی. ستون‌های ۱-۳: بيان ۲ ساعت پس از القاء، ستون ۴: نشانگر وزن مولکولي پروتئين، ستون ۵: کنترل منفی حاوی ژن بدون القاء با IPTG، ستون‌های ۶-۸: بيان ۴ ساعت پس از القاء، ستون‌های ۹ و ۱۰: بيان يك شب پس از القاء

پس از بهينه‌سازی زمان، بررسی بيان پروتئين در شرياط بي وزني شبие‌سازی شده انجام شد. ميزان بيان در شرياط بي وزني شبие‌سازی شده نسبت به جاذبه طبیعی زمین، به کمک روش SDS-PAGE جاذبه طبیعی مقایسه شد (شكل ۳). نتایج نشان داد که بيان پروتئين نوترکيب در فالكون نیمه پر در شرياط جاذبه طبیعی به دلیل هوادهی، بيشتر از بقیه حالات بود.



شكل ۳- بيان پروتئين STX2B در شرياط مختلف به مدت يك شب. ستون ۱: القاء بيان درون فالكون پر فاقد هوادهی در شرياط جاذبه طبیعی، ستون ۲: کنترل منفی بيان درون فالكون پر بدون القاء با IPTG، ستون ۳: مارکر پروتئين، ستون ۴: بيان درون فالكون پر در شرياط بي وزني شبие سازی شده، ستون ۵: کنترل منفی بيان درون فالكون پر در شرياط بي وزني شبие سازی شده بدون القاء با IPTG، ستون ۶: بيان درون فالكون همراه با هوادهی در شرياط جاذبه طبیعی، ستون ۷: کنترل منفی بيان درون فالكون همراه با هوادهی در شرياط جاذبه طبیعی بدون القاء با IPTG

توسط SDS-PAGE بهطور كامل از يكديگر تفكيك شده و سپس به غشای PVDF منتقل شد. پس از شستشوی غشا و قرارگيري در بافر مسدودکننده حاوی شير خشک بدون چربی، Anti His tag رديابي پروتئين نوترکيب استفاده شد. بهمنظور آشكارسازی از قرص‌های DAB به عنوان سوبستراي آنزيم استفاده شد [۲۲].

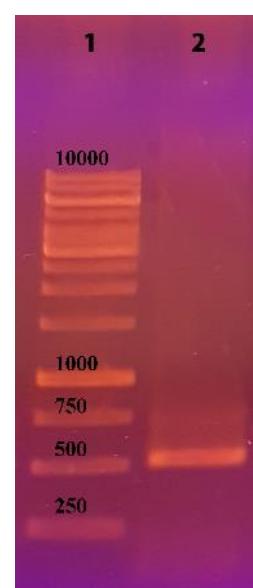
در مرحله بعد، برای تعين غلظت پروتئين نوترکيب، با استفاده از سرم آلبومين گاوی (سيانژن) به عنوان استاندارد، منحنی استاندارد به روش برادفورد ترسیم شد و سپس غلظت پروتئين تخلیص شده در مقایسه با نمودار تعیین شد [۲۰].

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

در انتهای نمودارها با استفاده از نرمافزار GraphPad Prism 8 ترسیم شدند و از نرم‌افزار آماری SPSS، برای مقایسه ميزان بيان پروتئين‌ها در شرياط مختلف بررسی شد. مقدار $p\text{-value} \leq 0.05$ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بين گروه‌ها درنظر گرفته شد.

يافته‌ها

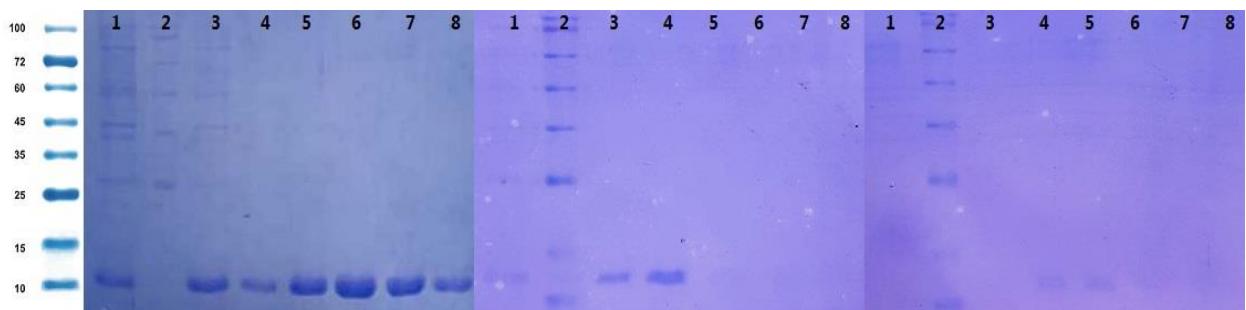
با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز يك درصد محصول اختصاصی مربوط به تکثیر ژن *stx2B* تکثیر شده با روش PCR، تأييد شد. با توجه به اينكه از پرایمرهای عمومی T7 جهت تکثیر ژن *stx2B* استفاده شد به اندازه تقریبی ۱۵۰ bp به ابتدا ۱۵۰ bp به انتهای ژن اضافه شده است. بنابراین به طور تقریبی ۳۰۰ جفت باز به قطعه ژنی اضافه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



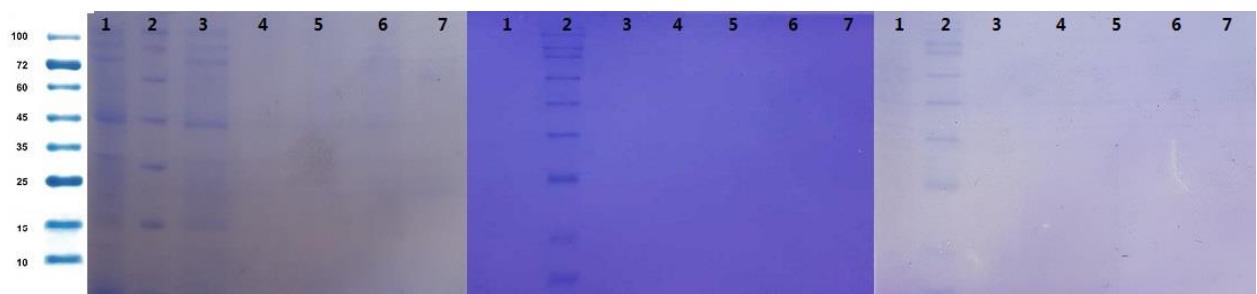
شكل ۱- تأييد حضور سازه ژنی PCR. ستون ۱: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی وزن مولکولي، ستون ۲: محصول تکثیر ژن با پرایمرهای عمومی T7

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).

به منظور دست‌یابی به مقادیر کمی پروتئین نوترکیب بیان شده 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-PAGE بررسی شدند (شکل‌های ۴ و ۵).



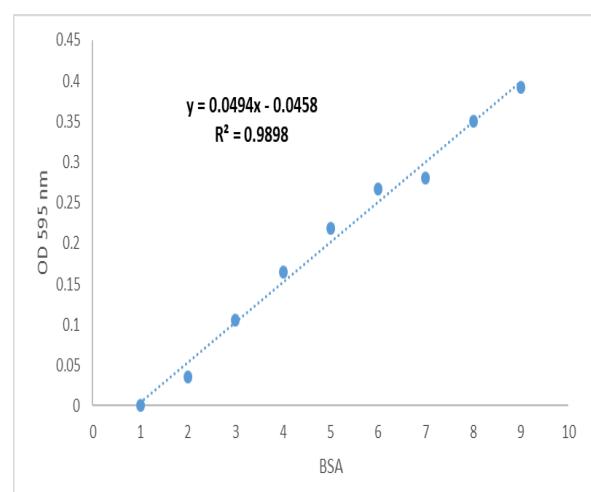
شکل ۴- خالص سازی پروتئین نوترکیب در فاز نامحلول. A. فالکون همراه با هوادهی و شرایط جاذبه طبیعی، B. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی و C. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط بی وزنی (ستون‌ها به ترتیب شامل ۱: محلول عبوری از ستون، ۲: مارکر پروتئین، ۳: شستشو، ۴ تا ۸: مراحل خالص سازی).



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).

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 بی وزنی شبیه‌سازی شده	محلول	۶۳	۰/۱۹
	نامحلول	۱۲۲	۱/۵۶

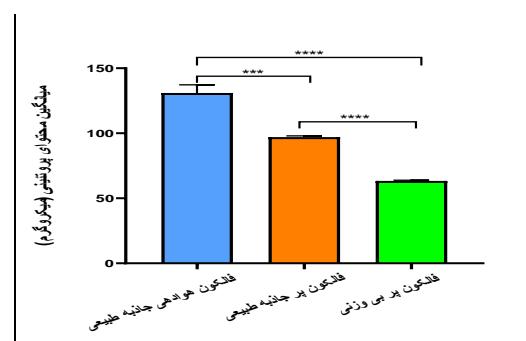


شکل ۶- منحنی استاندارد برادفورد ترسیم شده توسط غلظت‌های مختلف BSA

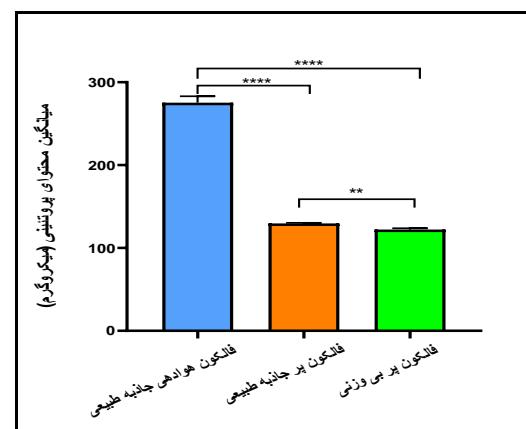
بحث و نتیجه‌گيري

پروتئين‌ها به عنوان 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 تجاري پروتئین‌ها به صورت نوترکيب جهت کاربردهای صنعتی، کشاورزی، پزشکی، دارویی و واکسن کمک نموده است. از معضلاتی که ممکن است حین تلاش برای دستیابی به حداقل مقدار پروتئین نوترکيب به وجود آید نامحول شدن پروتئین بیان شده و تشکیل اجسام توده‌ای در سیتوپلاسم باکتری به دلیل تاخوردگی نامناسب است. رفع این مشکل از نظر بیوتکنولوژی اهمیت به سزايد دارد و در همین مسیر روش‌های متعددی برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و دستیابی به پروتئین محلول وجود دارد که شامل تغیير در عواملی نظیر درجه حرارت، تنظیم میزان بیان، کاهش متاپولیسم میزان و غلظت ماده القاء کننده یا تغیيرات مهندسی روی پروتئین هدف مانند اتصال دنباله مناسب به پروتئین و نیز بیان همزمان چاپرون‌های است که تاخوردگی مناسب پروتئین را افزایش می‌دهند. همچنان اگر علت نامحول بودن پروتئین، بیان بیش از حد آن باشد می‌توان با کاهش دادن سطح بیان پروتئین به این مشکل غلبه نمود. از میان روش‌های ذکر شده، مهمترین عمل، تغیير شرایط رشد باکتری است زیرا مخصوص شده است که تغیير شرایط رشد مانند تغیيرات دما، تراکم اولیه کشت و طول مرحله بیان، می‌تواند میزان بیان پروتئین محلول را با تاخوردگی آن تغيير دهد [۲۳]. علاوه بر این ثابت شده است که رشد و القاء سلول‌ها تحت شوك حرارتی و کنترل استرس اسمزی، خالصیت برخی از پروتئین‌های نوترکيب را افزایش می‌دهد [۲۴]. با اين حال هنوز محدودیت‌هایی برای ارتقاء پيشتر تولید پروتئين وجود دارد.

شرایط بی‌وزنی به دليل تغييرات جاذبه، انتقال جرم و تأمین مواد مغذي برای پاسخ سلولی و در نتيجه تغييرات فيزيکوشيميايی، به عنوان يك شرایط خاص و منحصر به فرد در نظر گرفته می‌شود و مطالعات چندی نشان داده اند که شرایط بی‌وزنی، باعث افزایش تولید برخی پروتئین‌های نوترکيب شده است [۲]. مطالعات گسترده ژنمی و پروتومی انجام پذيرفته توسط هوانگفو و همكاران که به بررسی علل افزایش بیان پروتئین نوترکيب بتاگلوكورونیداز در شرایط SMG پرداخته اند نشان داده که ژن‌های مرивوط به ریبوزوم و RNA پلی افزایش بیان داشته‌اند. همچنان ثابت شده است که تاخوردن مؤثر پروتئین‌ها پس از ترجمه، گردهمایی پلی‌پپتیدها به صورت ساختارهای الیگومريک و استقرار پروتئين‌ها، به واسطه پروتئين‌های اختصاصی به نام چاپرون‌های مولکولي امکان‌پذير است. چاپرون‌ها دسته دیگري از

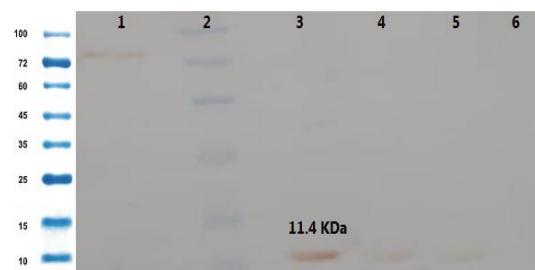


شكل ۷- پروتئين‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نوترکيب تخلیص شده با روش محلول (Native) در شرایط مختلف، اختلاف معنی دار نشان داد (P≤0.05, Mann-Whitney U test). (**): p-value is less than 0.0001, (***): p-value is less than 0.001).



شكل ۸- پروتئين‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نوترکيب تخلیص شده با روش نامحول (Denature) در شرایط مختلف، اختلاف معنی دار نشان داد (P≤0.05, Mann-Whitney U test). (**): p-value is less than 0.0001, (**): p-value is less than 0.01).

پروتئين نوترکيب بیان شده با توجه به دنباله هیستیدینی متصل به آن، از طریق روش وسترن بلاستینگ با آتنی بادی بر علیه His-tag مشاهده باندهای مورد نظر شده بر روی غشا PVDF تأیید شد (شکل ۹).



شكل ۹- تأیید پروتئين نوترکيب با روش وسترن بلاستینگ. ستون ۱: کنترل مثبت (پروتئين حاوي دنباله هیستیدینی)، ستون ۲: مارکر وزن مولکولي، ستون ۳: فالکون نیمه بر با هوا دهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۴: فالکون بر فاقد هوا دهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۵: فالکون پر فاقد هوا دهی در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، ستون ۶: کنترل منفی (نمونه بدون القا).

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 (جتاب) باشد. به این صورت، عملاً هواهی 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 هواهی، باید بسیار کم باشد اما نتایج کار نشان داد که در شرایط بی وزنی شبیه سازی 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 هواهی) بودیم. بدیهی است این میزان بیان، در صورت اکسیژن رسانی به میزان چشمگیری افزایش خواهد داشت. در مقایسه کلی، هم در شرایط بی وزنی و هم جاذبه طبیعی، بیان پروتئین در حالت نامحلول بیشتر از حالت محلول بوده است. علاوه بر این در شرایط واقعی فضاء، با وجود برقراری بی وزنی، 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 میزان E. coli در شرایط بی وزنی در دستگاه شبیه ساز HARV⁷ که امکان تبدیل 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 میزان P. pastoris در شرایط بی وزنی در دستگاه شبیه ساز LSMMG⁸ را که در آن نیز امکان تبدیل 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 تبدلات گازی و همچنین تغییر میزان می‌توان به بررسی اثر یک جانبه شرایط بی وزنی بر میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب پرداخت [۲۹].

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 بهمنظر افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب سودمند باشد [۲ و ۸].
E.coli O157:H7 مطالعه بر روی شیوع و گسترش باکتری به عنوان مهم‌ترین سروتیپ اشیشیا کلای خونریزی دهنده 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 آنتی‌بیوتیکی 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 ایجاد کننده بیماری و همچنین محرک پاسخ‌های اینمی را در غالب پروتئین‌های نوترکیب تهییه کرد و از آن‌ها به عنوان کاندیدای واکسن عليه انواع پاتوژن‌ها به جای واکسن‌های سنتی استفاده کرد [۲۶، ۲۵]. با توجه به عملکرد پروتئین STx2B جهت اتصال سم شبه شبیگا به سلول میزان و قابلیت ایجاد پاسخ اینمی 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 تراکم اسیدهای آینه آن، موجب سیستم اینمی قرار گیرد و با توجه به تراکم اسیدهای آینه آن، موجب تحریک پاسخ اینمی هومورال در میزان 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 در شرایط بی وزنی نسبت به شرایط جاذبه طبیعی [۲]، در این پژوهش بیان پروتئین نوترکیب STx2B در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده مورد بررسی و سنجش قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، پس از بهینه‌سازی زمان بیان پروتئین نوترکیب STx2B و تأیید ابتدا از طریق دنباله هیستیدینی توسعه آنتی بادی His-tag، بیان آن در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده القاء شد و پس از تخلیص با هر دو روش محلول و نامحلول توسعه ستون کروماتوگرافی Ni-NTA و تأیید نهایی، میزان آن مورد سنجش قرار گرفت. E. coli به عنوان میزان تولیدکننده، یک باکتری هوازی-بی هوازی 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

- 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." *Applied 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.

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 pH 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 pH پروتئین STx2B، بتوان به میزان بالاتری از پروتئین نوترکیب با حلایت بالاتر دست یافت. البته مشخص شده است که کاهش pH می‌تواند بر روی رشد باکتری میزان نیز اثرگذار باشد. علاوه بر این با افزایش میزان مواد مغذی موجود در محیط کشت یا حتی تعییر 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 میکرووارگانیسم 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 قبل از زیابی و بررسی‌های گسترده‌تر است.

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسنندگان بیان نشده است.

مراجع

- 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.
- 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.
- P.R. Murray, and K.S. Rosenthal, *Review of medical microbiology*, Elsevier Health Sciences, 2005.
- M. Rojas-Lopez, and et al., "Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine

- 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.
- [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 Wiley 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*