

بهینه‌سازی تولید پپتیدی رومیپلاستیم نوترکیب در اشرشیا کلی

صالح شهبازی آذر^۱، سیدحسن حسنی کومله^{۲*}، احد یامچی^۳، مجید شهبازی^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۸/۱۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: رومیپلاستیم یک پروتئین پیوندی است که در بدن عملکردی مشابه با پروتئین ترومبوپوئین دارد و بدین‌وسیله باعث تحریک مغز استخوان برای ساخت بیش‌تر پلاکت می‌شود. ترومبوپوئین هورمونی است که تولید پلاکت را کنترل می‌کند. داروی رومیپلاستیم در درمان ترومبوسیتوپنی در بیماران دارای ایمون ترومبوسیتوپنی مزمن (ITP) زمانی که سایر داروها مانند گورتیکواستروئیدها و ایمنوگلوبولین‌ها و یا عمل جراحی برداشتن طحال جواب نداده باشد، استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه، کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن و خالص‌سازی پپتیدی رومیپلاستیم نوترکیب در باکتری اشرشیا کلی بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه کاربردی، متغیرهای مستقل مورد استفاده شامل میزان OD (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی مولار) و نوع محیط کشت (LB, TB, M9) بودند که از روش سطح پاسخ (RSM (Response Surface Methodology)) در قالب طرح مرکب مرکزی با نرم‌افزار Design-Expert 12 برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید رومیپلاستیم استفاده گردید.

یافته‌ها: میزان OD برابر ۰/۸، غلظت IPTG برابر ۱ میلی مولار و محیط کشت LB بهترین حالت برای تولید پپتیدی رومیپلاستیم نوترکیب بهینه‌سازی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: از آنجائی که تولید بهینه پپتیدی موردنظر بود، کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن و خالص‌سازی پپتیدی رومیپلاستیم در سویه BL21 از باکتری اشرشیا کلی با بهینه‌ترین شرایط که توسط RSM انجام گردید، صورت گرفت. همچنین برای اینکه پروتئین به نحو صحیح فولد شود، از مرحله ری‌فولدینگ در ابتدای خالص‌سازی استفاده شد. پروتئین‌های دارویی نقش مهمی در درمان‌های نوین پزشکی مولکولی دارند.

کلیدواژه‌ها: کلونینگ، بهینه‌سازی، پپتیدی، خالص‌سازی، رومیپلاستیم

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره نهم، ص ۵۱۸-۵۳۴، آذر ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: استان گیلان، رشت، دانشگاه گیلان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تلفن: ۰۱۷۳۴۵۳۳۵۱۸

Email: kumleh@guilan.ac.ir

مقدمه

هر رشته علمی دیگر به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌هایی که دامنه و دقت آزمایش‌ها را گسترش می‌دهند، وابسته است (۵،۶). رومیپلاستیم یک پپتیدی است که شامل چهار اتصال TPO-R (Targeting Thrombopoietin receptor) است، دمین‌ها (شناسایی شده به‌وسیله غربالگری کتابخانه‌های جهش‌زایی پپتیدی) میل ترکیبی بالایی برای TPO-R (MPL (Myeloproliferative Protein Leukemia) و یک دمین حامل Fc (fragment crystallizable) دارند و با توالی با TPO درون‌زا همسانی ندارد، رومیپلاستیم به TPO-R روی پیش‌سازهای مگاکاریوسیت در مغز استخوان متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند. به همان روش TPO

رومیپلاستیم یک پروتئین پیوندی و آنالوگ ترومبوپوئین است. ترومبوپوئین هورمونی است که تولید پلاکت را کنترل می‌کند. این دارو در درمان پورپورای ناشناس کاهش پلاکت توسط سازمان غذا و دارو آمریکا به‌منظور استفاده در مواردی از این بیماری که پاسخی به درمان‌های رایج همچون ایمنوگلوبولین وریدی، کورتون‌ها، تزریق روگام و جراحی طحال‌برداری نداده‌اند، تأیید شده است. رومیپلاستیم با استفاده از فن‌آوری DNA نوترکیب در *E. coli* تولید می‌شود و وزن مولکولی تقریبی آن نیز برابر ۶۰ کیلو دالتون است (۴-۱). پیشرفت در مهندسی ژنتیک و پروتئین‌های نوترکیب مانند

^۱ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ دانشیار بیوشیمی و بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار مهندسی ژنتیک، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۴ استاد ایمونولوژی و ژنتیک، گروه ژنتیک انسانی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

درون‌زا متصل می‌شود و می‌تواند TPO را از گیرنده آن جابجا کند، رومیپلاستیم بسیاری از مسیرهای مشابه TPO را فعال می‌کند، که منجر به بهبود مستمر تعداد پلاکت‌ها با ادامه درمان در بیماران مبتلایه ITP (Immune Thrombocytopenic Purpura) می‌شود (۷). تعامل با گیرنده‌های Fc γ ممکن است به رومیپلاستیم اجازه دهد تا حفظ تحمل هومورال، بلوغ سلولی، ارائه آنتی‌ژن و گسترش سلول‌های T تنظیم‌کننده را اصلاح کند. درنهایت، رومیپلاستیم ممکن است بتواند سلول‌های T تنظیم‌کننده را از طریق دو اپی‌توپ از ناحیه Fc به نام اپی‌توپ‌های تنظیمی T فعال کند. کاوش بیشتر در مورد این مکانیسم‌ها در عملکرد پیتی‌بادی‌ها ضروری است. اتصال رومیپلاستیم طیف وسیعی از مسیرهای سیگنالینگ را فعال می‌کند که زنده ماندن سلولی، رشد سلولی، اندومیتوز مگاکاریوسیتی، بلوغ مگاکاریوسیتی، و مهم‌تر از همه، تولید پلاکت را افزایش می‌دهد (۷). رومیپلاستیم دامنه خارج سلولی TPO-R را فعال می‌کند، درحالی‌که الترومبوپاگ و اواترومبوپاگ (نوعی روش درمانی) بخش‌گذارنده TPO-R را فعال می‌کنند، که می‌تواند منجر به سطوح مختلف فعالیت TPO-R و درنتیجه پاسخ‌های متفاوت در بخش سلول‌های بنیادی و مگاکاریوسیت شود. داده‌های مختلف نشان می‌دهد که اتصال رومیپلاستیم منجر به فسفوریلاسیون تیروزین و فعال شدن متعاقب آن مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دستی Mpl، JAK2-STAT5، ERK1/2 و AKT می‌شود که منجر به رونویسی ژن و افزایش تکثیر مگاکاریوسیتی می‌گردد. مشابه با TPO درون‌زا، رومیپلاستیم رشد سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی مگاکاریوسیت را تحریک می‌کند و تعداد مگاکاریوسیت‌ها، اندازه و پلوئیدی را افزایش می‌دهد. نقش کلات آهن داخل سلولی در اثر الترومبوپاگ منحصربه‌فرد است، اما تأثیر بالینی آن مشخص نیست. درمجموع، این ویژگی‌های رومیپلاستیم دلایلی را روشن می‌کند که چرا یک گزینه درمانی خوب برای ITP (Immune thrombocytopenia) است و ممکن است در سایر شرایط هماتولوژیک که منجر به ترومبوسیتوپنی می‌شوند مفید باشد (۹-۷). رومیپلاستیم هم‌زمان با اریتروپویتین، فاکتور سلول‌های بنیادی IL-3 (Interleukin 3)، IL-6 (Interleukin 6) و GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) در تحریک رشد کلنی مگاکاریوسیت در شرایط آزمایشگاهی عمل می‌کند (۱۰). فاکتورهای رشد خونی متعددی باعث تحریک تولید پلاکت‌ها از جمله فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت-ماکروفاژ (GM-CSF)، فاکتور سلول‌های بنیادی، اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۳، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱۱ می‌شوند. برخی از این فاکتورهای رشد نشان می‌دهند که باعث افزایش تولید پلاکت در بیماران مبتلا به

شیمی‌درمانی می‌شوند. اینترلوکین ۱۱ در حال حاضر توسط غذا و داروی ایالات متحده برای درمان ترومبوسیتوپنی ناشی از شیمی‌درمانی تأیید شده است. نقش اصلی این عوامل تولید پلاکت نیست بلکه ترومبوپویتین فاکتور رشدی است که برای تولید پلاکت بسیار مهم است (۱۱-۱۳). با توجه به مزایای مولکول ترومبوپویتین نو ترکیب انسانی، تلاش شد تا ترومبوپویتین جدیدی ایجاد شود که آنتی‌ژن نبوده و خواص دارویی را بهبود بخشد. در سال ۱۹۹۷، یک پپتید ۱۴ آمینواسیدی شناسایی شد که هیچ‌گونه توالی مشترکی با ترومبوپویتین نداشت اما به گیرنده ترومبوپویتین متصل و آن را فعال می‌کرد. اتصال پیوند شیمیایی دو پپتید ۱۴ اسید آمینه‌ای در مقایسه با ترومبوپویتین نو ترکیب باعث شد تا فعالیت آن ده هزار برابر افزایش پیدا کند (۱۴). پپتید دایمر به علت دارا بودن دو سایت اتصال مختلف به رسپتور، می‌تواند مانند ترومبوپویتین درون‌زا به‌طور مؤثری به گیرنده ترومبوپویتین متصل و آن را فعال نماید. ترومبوپویتین پایدار و فعال با اتصال چهار پپتید حاوی ۱۴ اسید آمینه به پایانه کربوکسیل قطعه Fc IgG1 (Immunoglobulin G1) حاصل شد که درنهایت یک پلترم بیولوژیکی جدید به نام پیتی‌بادی ایجاد شد (۱۵،۱۶). فیاض و همکاران در مطالعه‌ای به بیان، خالص‌سازی و ارزیابی فعالیت بیولوژیکی پیتی‌بادی بیوسیمار رومیپلاستیم پرداختند. آن‌ها از یک سازه حاوی باکتری اشرشیکالی ادغام‌شده با پیتی‌بادی استفاده نمودند (۱۷).

با عنایت به اینکه تاکنون در خصوص بهینه‌سازی شرایط بیان ژن رومیپلاستیم مطالعه‌ای انجام نشده است، لذا مطالعه حاضر باهدف کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن و خالص‌سازی پپتیدبادی رومیپلاستیم نو ترکیب در باکتری اشرشیا کلی انجام گردید.

مواد و روش کار

در این پژوهش کاربردی از باکتری (*Escherichia coli*) BL21 سویه *E. coli* برای بیان رومیپلاستیم استفاده شد. وکتور مورد استفاده در این مطالعه pET9a است. این وکتور دارای مارکر انتخابی کانامایسین و پروموتور T7 است. مراحل تهیه کشت بر اساس روش Zurawa-Janicka و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از تهیه LB broth، به آن سلول میزبان BL21 اضافه شد (۱۸). برای استخراج پلاسمید از تک کلنی‌های کشت داده‌شده داخل پلیت با استفاده از لوپ برداشته شد و داخل محیط LB broth کشت داده و مقدار ۵ میکرولیتر (۵۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک کانامایسین نیز اضافه گردید. سپس پلاسمید pET9a در مقیاس کوچک طبق دستورالعمل با کیت Thermo استخراج

ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE برده شدند و از هر کدام از نمونه‌ها، یک کنترل نیز گذاشته شد (۲۱).

با استفاده از روش آماری RSM، بررسی وضعیت بیان در OD (Optical Density) ها و غلظت‌های IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) مختلف، بهترین محیط کشت انتخاب گردید و ادامه کار با آن انجام شد. (تعداد نمونه‌ها توسط روش RSM تعیین شد) روش سطح پاسخ، اثرات مابین متغیرهای مستقل را به‌تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید. به‌علاوه، این روش می‌تواند مدلی ریاضی که دقیقاً کل فرآیند را توصیف کند، را ایجاد نماید.

همچنین بهترین OD و مقدار IPTG نیز انتخاب گردید (جدول ۱). برای این مرحله استوک Host Cell BL21 از فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و پس از هم دما شدن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آن داخل یک لوله حاوی محیط LB broth (Luria-Bertan) ریخته و سپس مقدار ۵ میکرولیتر (۵۰ mg/L) آنتی‌بیوتیک Kan (Kanamycin) به آن افزوده شد و به‌صورت overnight داخل شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۸۰ قرار گرفت. سپس پیش کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک Kan اضافه شد و داخل شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. حال با توجه به OD و IPTG های نوشته‌شده در جدول ۱ مرحله القاء انجام و پس از اضافه نمودن IPTG، ۵ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور با همان دما قرار داده شد. سپس محتویات کشت داده شده داخل یک فاکون استریل ریخته شد و در دور rpm ۶۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۲۲،۲۳).

گردید. واکنش زنجیره پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X، ۵/۰ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی مولار، ۵/۰ میکرولیتر از هر دو پرایمر اختصاصی (۱۰ پیکومول)، ۵/۰ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز (۵ واحد/میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم) استفاده گردید. در این مطالعه از یک برنامه چرخه حرارتی به‌طور اختصاصی برای پرایمرها استفاده گردید. برای مرحله واسرشت اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال شد. تکثیر در ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه صورت گرفت. یک سیکل نهایی شامل مرحله گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد TBE و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت در ۸۰ دقیقه الکتروفورز شد (۲۰،۱۹).

برای درج قطعه نوترکیب در پلاسمید، ابتدا لازم است که هم قطعه نوترکیب و هم پلاسمید به‌وسیله آنزیم‌های محدودگر یکسان، بریده شوند. برای انجام هضم آنزیمی در ابتدا و انتهای قطعه نوترکیب، جایگاه برش برای آنزیم‌های *BamHI* و *XbaI* تعبیه شد. پلاسمید pET9a هم در جایگاه کلونینگ خود محل‌های برش برای این دو آنزیم را داشت. مواد موردنیاز برای انجام واکنش هضم آنزیمی شامل آب استریل (۲ میکرولیتر)، بافر ۱۰X (۴ میکرولیتر)، آنزیم *BamHI* ۱ میکرولیتر (۱۰ unit/ μ l)، آنزیم *XbaI* ۱/۲ میکرولیتر (۱۰ unit/ μ l)، پلاسمید و قطعه ژن، ۱۲ میکرولیتر (۱ ماکروگرم) بود. به‌منظور اطمینان از انجام واکنش هضم آنزیمی، نمونه‌ها بر روی

جدول (۱): طراحی آزمایش مرحله اول با RSM

فاکتور			
سطح		Host Cell	IPTG (mM)
OD			
۱	۰/۴	M9 ¹	۰/۵
۲	۰/۸	LB ²	۱
۳	۱/۲	TB ³	۱/۵
RSM با ۳ فاکتور			
Run	Factor 1: OD	Factor 2: Host Cell	Factor 3: IPTG
۱	۰/۴	M9	۰/۵
۲	۰/۴	M9	۱/۵
۳	۰/۸	M9	۱

¹ Lysogeny broth

² Terrific Broth

³ Minimal Salts

فاکتور	سطح		
	OD	Host Cell	IPTG (mM)
۰/۵	۱/۲	M9	۴
۱/۵	۱/۲	M9	۵
۱	۰/۴	LB	۶
۰/۵	۰/۸	LB	۷
۱/۵	۰/۸	LB	۸
۱	۰/۸	LB	۹
۱	۰/۸	LB	۱۰
۱	۰/۸	LB	۱۱
۱	۱/۲	LB	۱۲
۰/۵	۰/۴	TB	۱۳
۱/۵	۰/۴	TB	۱۴
۱	۰/۸	TB	۱۵
۱/۵	۱/۲	TB	۱۶
۰/۵	۱/۲	TB	۱۷

سپس آن را سانتریفیوژ و سوپرناتانت آن به ستون sp-سفازر لود شد و همراه آن از نمک ۱۰۰ میلی مولار با pH=5 به صورت گرادینت تا ۵۰۰ میلی مولار استفاده گردید. (۲۵).

یافته‌ها

توالی ژن و بهینه‌سازی کدونی:

توالی آمینواسیدی پپتیدای رومیپلاستیم و توالی نوکلئوتیدی آن از پایگاه داده Drug bank (www.drugbank.ca) برداشته شد. برای اطمینان از بیان مطلوب ژن خارجی در باکتری، توالی ژنی بر اساس ترجیح کدونی بهینه‌سازی گردید. بهینه‌سازی بر اساس ترجیح کدونی، کدون دوتایی و ساختار دوم توالی mRNA (Messenger RNA) با استفاده از سایت Genescript انجام گرفت (<http://www.genescript.com>).

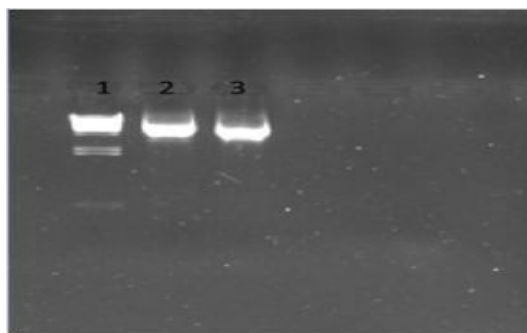
MDKTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKGGGGGIEGPTLR
QWLAARAGGGGGGGGIEGPTLRQWLAARA

استخراج پروتئین با استفاده از سانتریفیوژ، امواج اولتراسوند و بافر شستشو، SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و وسترن بلاتینگ با استفاده از مقاله ابراهیمی‌فرد و همکاران و طبق روش آن‌ها صورت گرفت (۲۴). در انتها خالص‌سازی پروتئین نوترکیب انجام شد، رسوب حاصل از فرمنتیشن (اینکلوژن بادی) را در محلول حاوی گوانیدین ۶ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار، DTT (Dithiothreitol) ۸ میلی مولار با pH=8.7 به مدت یک ساعت حل گردید. سپس آن را در اوره ۲ مولار، تریس ۵۰ میلی مولار، آرژنین ۱۶۰ میلی مولار، سیستئین ۳ میلی مولار با pH=8.5، ۲۰ برابر رقیق نموده و به مدت یک شب بر روی استیرر و در جای سرد قرار داده شد. حال محلول را در تریس ۱۰ میلی مولار و اوره ۱/۵ مولار با pH=9 حل کرده و

استخراج پلاسמיד نوترکیب:

انجام عملیات استخراج با بارگذاری ۷ میکرولیتر از ناقل استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی و تأیید شد (شکل ۱).

به‌منظور انجام واکنش الحاق ژن در ناقل، استخراج ناقل با استفاده از کیت استخراج ناقل شرکت Thermo انجام شد و درستی

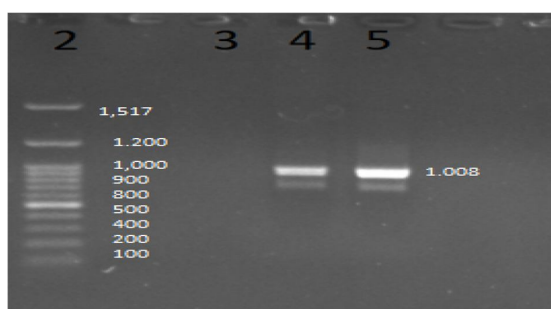


شکل (۱): استخراج پلاسمید pET9a (۱. مارکر 100 bp، ۲ و ۳. ناقل pET9a استخراج شده)

الکتروفورز محصول PCR برای تأیید استخراج پلاسمید:

نتیجه الکتروفورز محصول حاصل از PCR نشان داد که تکثیر قطعه حاوی ژن رومیپلاستیم به خوبی صورت پذیرفته و حضور قطعه

تکثیر شده دارای اندازه ۱۰۰۸ جفت بازی، جای‌گیری ژن رومیپلاستیم در وکتور را تأیید می‌کند.



شکل (۲): الکتروفورز محصول PCR با استفاده از مارکر ۱۰۰ جفت بازی. (۲. مارکر 100 bp، ۳. کنترل منفی، ۴ و ۵. پلاسمید pET9a به همراه ژن رومیپلاستیم)

بهینه‌سازی فرآیند بیان ژن رومیپلاستیم:

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم به اندازه کافی بیان‌گر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. $R^2 = 0.9653$ موید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۶/۵۳ درصد از کل تغییرات در دامنه‌ی مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده که به ترتیب ۰/۹۶۵۳ و ۰/۹۳۴۰ به دست آمدند، بیان‌گر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند. همچنین مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). از آنجا

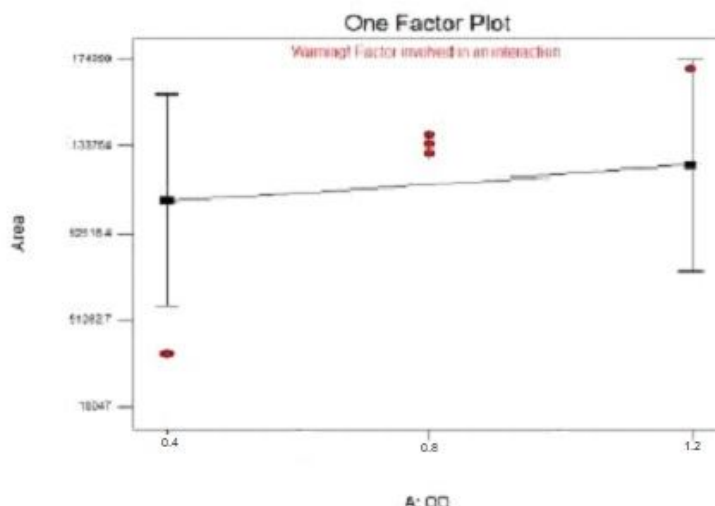
که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود؛ مدل بر اساس پارامترهای مختلف برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه تعیین شده برای متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور برای متغیرها ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند، که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه‌داشته شده است.

انتخاب بهترین OD:

در این مرحله یکی از متغیرهای مستقل بیان رومیپلاستیم در سه OD مختلف (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲) با طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی

CCD (Central Composite Design) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان رومیپلاستیم استفاده و با توجه به شکل ۳ می‌توان بیان کرد که تغییرات غلظت میکروارگانیزم به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان رومیپلاستیم تأثیر داشته است (۰/۰۵).

رومیپلاستیم هم راستا با افزایش غلظت میکروارگانیزم روند افزایشی داشته اما نمونه‌های حاوی غلظت ۰/۸ از میکروارگانیزم سبب بیشترین میزان بیان رومیپلاستیم شده همچنین کمترین میزان بیان رومیپلاستیم در نمونه‌های حاوی غلظت ۰/۴



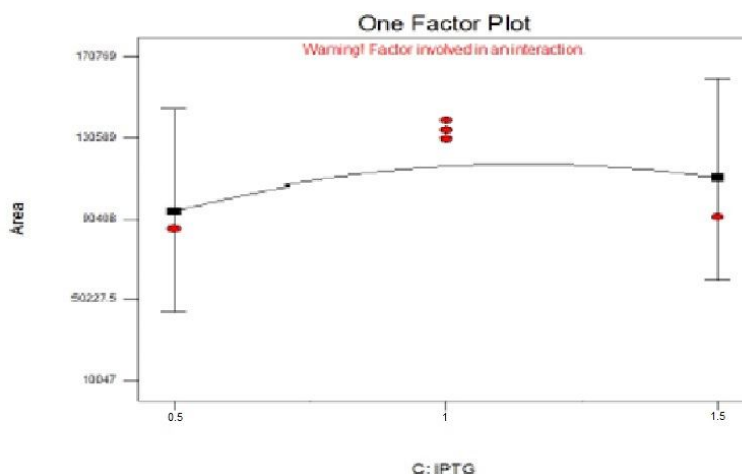
(P>). با توجه به شکل همان گونه که مشخص است، میزان بیان میکروارگانیزم بوده است.

شکل (۳): تأثیرات دانسیته نوری (OD) بر بیان رومیپلاستیم نسبت به سطح زیر منحنی پروتئین. نقاط قرمز سمت چپ پایین و سمت راست بالا بیانگر حداقل و حداکثر میزان OD برحسب Area می‌باشد و نقاط قرمز وسط تصویر مربوط به نقاط مرکزی و تکرار شونده است.

انتخاب بهترین غلظت القا کننده (IPTG):

در این مرحله یکی دیگر از متغیرهای مستقل بیان رومیپلاستیم در سه غلظت IPTG مختلف (۰/۰۵، ۱ و ۱/۵ میلی مولار) بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی

(CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان رومیپلاستیم استفاده و با توجه به شکل ۴ بهترین غلظت IPTG برای بیان رومیپلاستیم برابر با ۱ میلی مولار می‌باشد که این ناحیه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد.

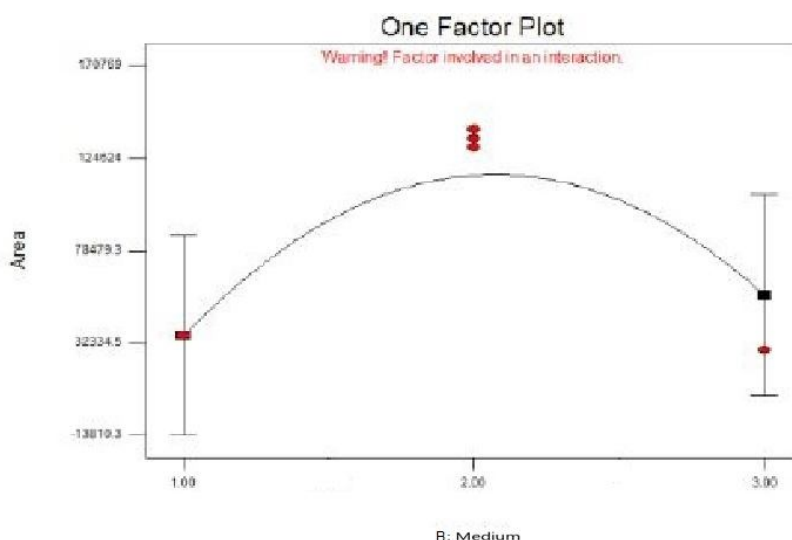


شکل (۴): تأثیرات غلظت IPTG بر بیان رومیپلاستیم نسبت به سطح زیر منحنی پروتئین

متغیرهای مستقل بر میزان بیان رومیپلاستیم استفاده نمودیم و با توجه به شکل ۵ می‌توان بیان کرد که تغییرات محیط کشت به‌طور معنی‌داری بر میزان بیان رومیپلاستیم تأثیر داشته است ($P < 0.05$). با توجه به شکل ۵ همان گونه که مشخص است، میزان بیان رومیپلاستیم هم راستا با تغییر محیط کشت روند افزایشی داشته و نمونه‌های حاوی محیط کشت LB سبب بیشترین میزان بیان رومیپلاستیم شده همچنین کمترین میزان بیان رومیپلاستیم در محیط کشت M9 بوده است.

انتخاب بهترین محیط کشت:

فاکتورهای زیادی بر شرایط تخمیر مؤثر می‌باشند که می‌توانند بر رشد باکتری‌ها اثر بگذارند، یکی از آن‌ها نوع محیط کشت مورد استفاده می‌باشد. که ما در این مرحله از محیط کشت های LB, TB (Terrific Broth), M9 (Minimal Salts) که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی



شکل (۵): تأثیر محیط کشت بر بیان رومیپلاستیم نسبت به سطح زیر منحنی پروتئین

پاسخی مدلی تعریف می‌شود که اثر مستقل و متقابل متغیرها را بر روی هر پاسخ بررسی می‌کند (جدول ۲). تجزیه واریانس برای ارزیابی اثرات معنی‌دار متغیرهای فرآیند بر روی پاسخ انجام شد. با انجام تجزیه و تحلیل ضریب همبستگی (R^2) چند متغیره، مدل‌های مختلف بر اساس R^2 واقعی و R^2 پیش‌بینی شده مقایسه شد. به‌صورتی که مدلی که دارای بیشترین مقادیر این فاکتورها باشد دارای قدرت پیش‌بینی بالا و دقت بیشتری خواهد بود. آنالیز واریانس برای تعیین عدم برازش و معنی‌دار بودن اثرات خطی، درجه دوم و برهمکنش متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته صورت گرفت. اگر مقدار P برای آزمون عدم برازش در جدول ANOVA کوچک‌تر مساوی ۰/۰۵ بود به معنای کافی بودن مدل برای پیش‌بینی پاسخ موردنظر می‌باشد. بی معنی بودن مقدار F در جدول ANOVA برای عدم برازش مطلوب است و به معنای مناسب بودن مدل برای داده‌های مشاهده شده است (جدول ۳). درنهایت تیمار بهینه با توجه به نتایج پیش‌بینی می‌شود (جدول ۴).

ارزیابی نقطه بهینه برای فرآیند بیان رومیپلاستیم:

پس از انجام آزمون‌های اولیه محدوده مناسبه متغیرهای مستقل تولید رومیپلاستیم شامل (میزان OD، غلظت IPTG و نوع محیط کشت) از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان تولید رومیپلاستیم استفاده شد (جدول ۱). در بهینه‌سازی تولید رومیپلاستیم از ۱۷ تیمار بر اساس طرح مرکب مرکزی، شامل ۳ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده در این مرحله شامل میزان OD (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) و نوع محیط کشت (LB, M9, TB). نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۱ میلی‌مولار و نوع محیط کشت LB بود. همچنین پاسخ اندازه‌گیری شده شامل غلظت رومیپلاستیم با استفاده از سطح زیر منحنی پیک نمودار کروماتوگرام کروماتوگرافی مایع با فشار بالا بود. در روش سطح پاسخ برای هر

جدول (۲): بررسی اثر مستقل و متقابل متغیرها بر روی هر پاسخ

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Mean	7.696E+010	1	7.696E+010		Suggested
Linear	2.304E+009	3	7.680E+008	0.26	0.8543
2FI	1.638E+009	3	5.460E+008	0.15	0.9290
Quadratic	2.486E+010	3	8.287E+009	4.76	0.0410
Cubic	9.917E+009	4	2.479E+009	3.28	0.1785
Residual	2.270E+009	3	7.567E+008		
Total	1.179E+011	17	6.938E+009		

جدول (۳): ANOVA عدم برازش برای سطح پاسخ مدل

Squares	Sum of Square	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	2.880E+010	9	3.200E+009	1.84	0.2172 not significant
A	6.650E+008	1	6.650E+008	0.38	0.5561
B	1.020E+009	1	1.020E+009	0.59	0.4691
C	6.194E+008	1	6.194E+008	0.36	0.5696
A2	5.449E+005	1	5.449E+005	3.130E 004	0.9864
B2	1.310E+010	1	1.310E+010	7.52	0.0288
C2	5.144E+008	1	5.144E+008	0.30	0.6036
AB	9.710E+007	1	9.710E+007	0.056	0.8201
AC	8.482E+008	1	8.482E+008	0.49	0.5077
BC	6.926E+008	1	6.926E+008	0.40	0.5482
Residual	1.219E+010	7	1.741E+009		
Lack of Fit	1.215E+010	5	2.429E+009	118.67	0.0084 significant
Pure Error	4.094E+007	2	2.047E+007		
Cor Total	4.099E+010	16			

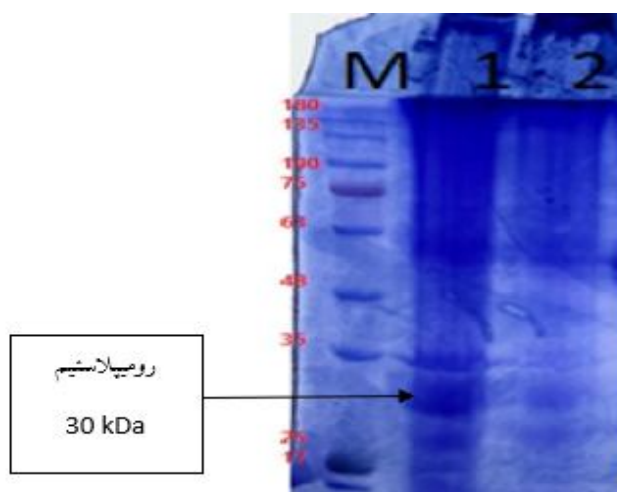
جدول (۴): بهینه‌سازی تیمارها و پیشنهاد بهترین تیمار

Solutions Number	OD	Medium	IPTG	Area	Desirability
1	0.8	2.14	1	132270	0.760 Selected
2	0.8	2.15	1.01	132269	0.760
3	0.8	2.14	1.02	132253	0.760
4	0.8	2.15	1.02	132251	0.760
5	0.8	2.16	1.03	131161	0.754

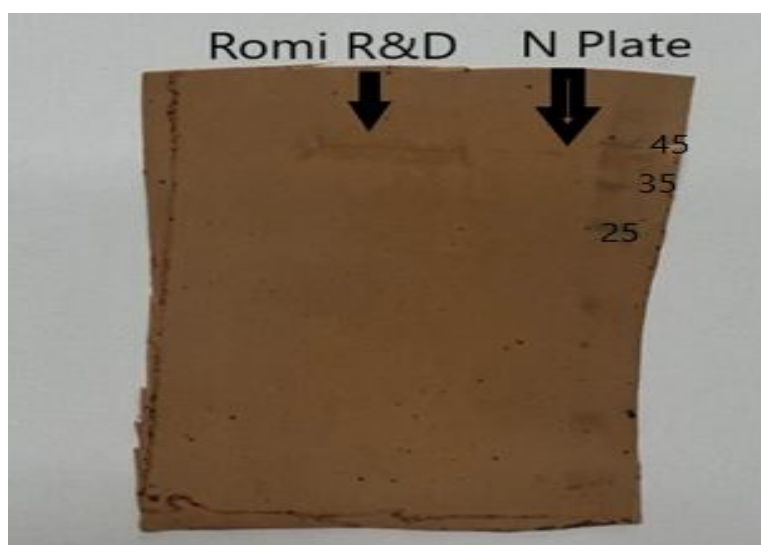
میکرولیتر از پروتئین استخراج شده پس از جوشاندن بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید که نتیجه آن در شکل ۶ نشان داده شده است. وزن مولکولی رومیپلاستیم قبل از خالص سازی ۳۰ کیلو دالتون می باشد. همچنین برای تأیید پروتئین مورد نظر از تست وسترن بلاتینگ نیز استفاده گردید (شکل ۷).

ارزیابی بیان رومیپلاستیم با استفاده از الکتروفورز:

باکتری ترانسفورم شده در حضور القا کننده بیان، کشت داده شد. قبل از افزودن IPTG یک نمونه به عنوان کنترل برداشته شد. پس از اتمام نمونه گیری استخراج پروتئین کل انجام گردید. ۲۰



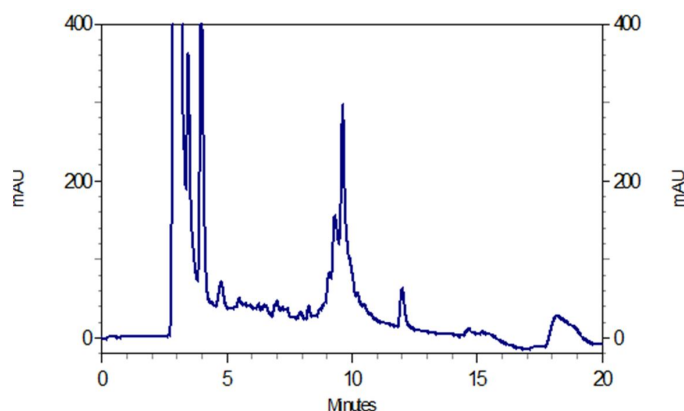
شکل (۶): نتیجه الکتروفورز پروتئین کل استخراج شده از باکتری بر روی ژل SDS-PAGE. چاهک شماره ۱ حاوی پروتئین نو ترکیب رومیپلاستیم، چاهک شماره ۲ کنترل منفی و M مارکر می باشد.



شکل (۷): نتیجه تست وسترن بلاتینگ پس از مرحله خالص سازی و اتصال دو سیگنال پپتید به هم.

ارزیابی نقطه بهینه از نظر HPLC:

بهترین نمونه بعد از مرحله استخراج پروتئین را از نظر بررسی ژل SDS-PAGE به دستگاه HPLC تزریق نمودیم و نتیجه به صورت زیر حاصل گردید (شکل ۸).



شکل ۸): نتیجه تست وسترن بلاتینگ پس از مرحله خالص سازی و اتصال دو سیگنال پپتید به هم.

بحث و نتیجه گیری

پروتئین های نوترکیب، بخش قابل توجهی از داروهای بیوتکنولوژی تأیید شده توسط FDA (Food and Drug Administration) را تشکیل می دهند. پروتئین های درمانی با توجه به ویژگی هایشان مانند خلوص موفقیت بسیاری در درمان کسب کرده اند و این امر در درمان بیماری هایی که نیازمند جایگزینی پروتئین می باشند، درمان توسط هورمون بروز بیشتری دارد. همچنین دسترسی نامحدود به این پروتئین های درمانی موجب توسعه درمان بیماری های مرتبط شده است که نیازمند به کارگیری تکنولوژی نوترکیب در تولید در مقیاس صنعتی دارای بازده بالا و فاقد اثرات جانبی می باشد (۲۶،۲۷). موفقیت تجاری هر بایوفارماسوتیکال به قابلیت دستیابی به تولید در مقیاس زیاد و مقرون به صرفه آن محصول نوترکیب بستگی دارد. در نتیجه، هزینه تولید محصول نوترکیب می تواند با افزایش بازده تولید در مقیاس زیاد، به حداقل برسد و برای دستیابی به بازده بالا راهکارهایی از جمله استفاده از میزبان مناسب، وکتور مطلوب، فرآیند افزایش مقیاس و همچنین فرآیند تخلیص آسان و ارزان ضروری می باشد (۲۸).

پروتئین ها در بدن دارای نقش بسیار مهم و گسترده ای در فرآیندهای زیستی، از قبیل انتقال مواد به درون سلول ها و بیرون از آن، تشکیل رسپتورها، تسریع واکنش های بیوشیمیایی و فرآیند سیگنالینگ هستند. برای مطالعات پزشکی استفاده از پروتئین های نوترکیب به صورت محلول بسیار مورد استفاده قرار گرفته و پروتئین های نوترکیب نسبت به سایر پروتئین ها دارای مزیت هایی هستند. یکی از این مزیت ها آن است که نسخه کپی شده و بازنویسی شده از ژن انسانی می تواند همانند پروتئین طبیعی بدن به طور

اختصاصی عمل نماید. همچنین پروتئین های نوترکیب به طور موثرتر و با هزینه کمتر و با فراوانی بیشتری تولید می شوند (۲۹). از طرفی تولید پروتئین در سیستم های پروکاریوتی محدودیت های جدی نیز به همراه دارد، فرآورده های حاصل به طور محسوسی با فرآورده های طبیعی انسانی اختلاف دارند. زیرا باکتری ها فاقد امکانات سلول های یوکاریوتی جهت انجام اصطلاحات پس از ترجمه که شامل فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون در پروتئین ها می باشد، هستند (۳۰). فقدان مکانیسم ترشحی مؤثر به محیط کشت معایب اصلی سیستم *E. coli* به عنوان یک سیستم بیان کننده می باشد. همچنین ممکن است عدم بیان پروتئین و بیان به میزان کم به دلیل سمیت پروتئین یا ارجحیت کدونی یا عدم شکل گیری صحیح باندهای دی سولفیدی در این سیستم رخ دهد. از طرفی شکل گیری اینکلوزن بادی نیز باعث تا شدن نادرست و حلالیت پایین پروتئین ها می شود که نیاز به تجهیزاتی می باشد تا بتوان آن ها را به صورت محلول درآورد، به همین دلیل برای برخی پروتئین های یوکاریوتی که در آن ها تغییرات پس از ترجمه نیاز می باشد، استفاده از سیستم بیانی *E. coli* مناسب نخواهد بود، اما ما در این مطالعه رومپلاستیم را با استفاده از فن آوری DNA نوترکیب در *E. coli* به صورت اینکلوزن بادی با وزن مولکولی تقریبی برابر ۵۹ کیلو دالتون تولید نمودیم، از دلایل انتخاب این میزبان، رشد سریع باکتری، هزینه کم و بیان قابل قبول در مدت زمان کوتاه و توانایی رشد سریع بر سوبستراهای ارزان و بسیاری از ابزارهای مولکولی، نام برد. البته برخی از پژوهشگران سیستم های بیانی یوکاریوتی را انتخاب می کنند، پروتئین های یوکاریوتی اغلب دارای پیوندهای دی سولفید هستند که در فولد شدن درست پروتئین، پایداری و فعالیت آن

شدن، در مرحله آخر پپتیدی‌های موردنظر مجدد تا شده و خالص‌سازی شد. پپتیدی‌های به دست آمده با تکنیک SDS-PAGE و وسترن ایمونوبلاتینگ تأیید شدند. فعالیت زیستی آن به‌صورت تزریق زیر جلدی در موش بررسی گردید. نتایج آن‌ها نشان داد که مولکول‌ها به‌طور صحیح تولید و خالص شده‌اند و آزمایش *in vivo* از افزایش معنی‌دار پلاکت‌ها نسبت به گروه کنترل خبر داد (۱۷) اینکلوژن بادی اجسام انکلوژنی هستند که در تولید پروتئین‌های نوترکیب به دلیل جمع شدن جزئی و تاخوردگی نامناسب به‌صورت بسته‌های کوچک در داخل دیواره باکتری‌ها جای گرفته‌اند. در این مطالعه هم پروتئین رومیپلاستیم به‌صورت اینکلوژن بادی بیان شد، و از آنجایی که پروتئین‌هایی که به‌صورت اینکلوژن بادی هستند، انجام ری‌فولد و ایجاد فرم *native* پروتئین که فعالیت داشته باشد، اهمیت فراوانی دارد. سپس نمونه‌های پروتئینی استخراج شده پس از انجام SDS-PAGE روی کاغذ نیتروسولوز لکه گذاری شدند. نقاط غیر اختصاصی موجود بر روی کاغذ توسط بافر، بلوکه شدند. پس از انجام سه مرحله شستشو، آنتی بادی مونوکلونال اولیه ضد رومیپلاستیم و سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم (Horseradish peroxidase) HRP مورد استفاده قرار گرفت. تأیید نهایی آن توسط آزمایش وسترن بلاتینگ صورت پذیرفت. پس از انجام مراحل وسترن بلاتینگ، باند پروتئینی در ناحیه حدود ۴۵ کیلودالتون مشاهده گردید که تأیید کننده نهایی تولید پروتئین تولید شده توسط باکتری *E. coli* BL21(DE3) در این مطالعه بود.

در مطالعه حال حاضر، بهینه‌سازی مرحله خالص‌سازی پروتئین رومیپلاستیم، پارامترهای Optical Density (OD)، IPTG و محیط کشت از روش آماری RSM استفاده شد، برای القا باکتری‌ها، به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب از غلظت‌های مختلف IPTG استفاده شد، زیرا بیان ژن‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت از IPTG صورت گرفته است. در این پژوهش از غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی مولار IPTG برای القا در مدت‌زمان ۵ ساعت استفاده شد. که در اکثر تحقیقات از غلظت یک میلی‌مولار برای القا استفاده شده بود (۳۴، ۳۵). از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش‌بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان پروتئین رومیپلاستیم استفاده و نتیجه این گونه شد که بهترین غلظت IPTG برای بیان این پروتئین برابر با ۱ میلی‌مولار می‌باشد که این ناحیه با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد. که همراستا با نتایج دیگر همکاران بود. در این مطالعه یکی از متغیرهای مستقل بیان پروتئین رومیپلاستیم در سه OD مختلف (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲) با طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد که از روش سطح پاسخ RSM بر میزان بیان پروتئین رومیپلاستیم استفاده

ضروری هستند. به دلیل ویژگی‌های پروتئین‌های دارای باند دی‌سولفید اغلب پروتئین‌های دارویی نیز دارای باند دی‌سولفید هستند بنابراین دستیابی به سیستم‌های گوناگون بیانی که بتوانند پروتئین‌های حاوی پیوندهای دی‌سولفید را به درستی با سرعت و بهره‌وری بالا و ارزان قیمت تولید کنند ضروری است. سیستم‌های گوناگونی جهت بیان پروتئین‌های دارای باند دی‌سولفید توسعه یافته‌اند که هر یک مزایا و معایب خود را دارند برای مثال سیستم‌های بیانی یوکاریوت نظیر سلول‌های تخمدان همستر، مخمر یا سلول‌های حشرات ظرفیت بیان پروتئین‌های پیچیده حاوی چندین پیوند دی‌سولفید را دارند اما بسیار کند و گران قیمت هستند. سیستم‌های بیانی بدون سلول نیز اگر چه مشکل سرعت را حل می‌کنند ولی برای مقیاس‌های زیاد مناسب نیستند، در نتیجه سیستم‌های بیانی پروکاریوت با بهره‌وری و سرعت بالا و قیمت پایین مناسب‌ترین گزینه برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هستند و در این بین اشریشیاکلی عمومی‌ترین گزینه بود. چانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه‌ای به تولید صنعتی داروهای نوترکیب در اشریشیاکلی و پیشرفت‌های اخیر آن پرداختند. نزدیک به ۳۰ درصد از پروتئین‌های درمانی نوترکیب تأیید شده در حال حاضر در اشریشیاکلی تولید می‌شود. با توجه به ژنتیک مشخص، رشد سریع و تولید پر بازده، اشریشیاکلی یک انتخاب ارجح برای بیان پروتئین‌های غیر گلیکوزیله در صنعت بیوتکنولوژی بوده است و از دلایل انتخاب این پژوهش می‌باشد، در نتیجه بیان و خالص‌سازی یک پروتئین نوترکیب از *E. coli* می‌تواند سریعتر، ارزان‌تر و آسان‌تر از ارگانسیم‌های دیگر باشد (۳۲-۳۰).

در این پژوهش رومیپلاستیم با موفقیت در باکتری *E. coli* تولید شد. رومیپلاستیم یک پروتئین فیوژن Fc پپتید دimer (پپتیدی) تحریک کننده ترومبوپوئین برای افزایش تولید پلاکت از طریق فعال شدن گیرنده ترومبوپوئین است این مولکول دارای دو زیر واحد تک زنجیره‌ای است که هر یک از آن‌ها از ۲۶۹ اسید آمینه تشکیل شده است. هر زیر واحد شامل یک دامین حامل IgG1 Fc است که به‌صورت کووالانسی به یک توالی پلی پپتیدی متصل شده است که شامل دو دامین اتصال برای واکنش با گیرنده ترومبوپوئین است. هر دامین از ۱۴ اسید آمینه تشکیل شده است (۳۳). فیاض و همکاران در سال ۲۰۱۶، در مطالعه‌ای به بیان، خالص‌سازی و ارزیابی فعالیت بیولوژیکی پپتیدی بیوسیمولار رومیپلاستیم پرداختند. آن‌ها از یک سازه حاوی باکتری اشریشیاکلی ادغام شده با پپتیدی بادی استفاده نمودند. این سازه شامل دو ترکیب پپتیدی تکراری که با گروه کربوکسیل IgG1Fc ترکیب شده، می‌باشند. این سازه در باکتری اشریشیاکلی منجر به بیان پروتئین به‌عنوان انکلوژن بادی گردید. انکلوژن بادی‌ها شکسته، شسته و پس از دنا توره و حل

گردید و بیان شد که تغییرات غلظت میکروارگانیسم به طور معنی داری بر میزان بیان رومیپلاستیم تأثیر داشته است ($P < 0.05$). نمونه های حاوی غلظت ۰/۸ از میکروارگانیسم سبب بیان بیشترین میزان رومیپلاستیم شده همچنین کمترین میزان بیان رومیپلاستیم در نمونه های حاوی غلظت ۰/۴ میکروارگانیسم بوده است. همچنین ما در این مرحله از محیط کشت های LB, TB, M9 که از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان پروتئین رومیپلاستیم استفاده نمودیم و بهترین محیط کشت برای بیان رومیپلاستیم، محیط کشت LB بود. این محیط کشت با توجه به سطح زیر منحنی پروتئین به دست آمد. عبدالله زاده و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه ای برای بهینه سازی تولید آنزیم پکتیناز از روش آماری RSM نیز استفاده نمودند. متغیرهای مورد بررسی به این روش پکتین، زمان انکوباسیون، آمونیوم کلراید و دی پتاسیم فسفات بودند که برای تولید بهینه آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند. بهینه سازی پکتین (به عنوان القا کننده آنزیم پکتیناز) تولید آنزیم را بیش از سایر موارد، افزایش داد. از طرف دیگر، آمونیوم کلراید (به عنوان منبع نیتروژن) نقش مهمی در کاهش تولید پکتیناز در حضور نیتروژن آلی داشت. در آخر آن ها به این نتیجه رسیدند که استفاده از روش RSM برای بهینه سازی تولید آنزیم مؤثر بوده و تولید آنزیم را تقریباً ۱۲ برابر افزایش داد (از ۱/۱۶ U/mg به ۱۴/۱۶ U/mg) (رساند(۳۶)). همچنین ابراهیمی فرد و همکاران در سال ۲۰۲۲، بیان ژن انتروکیناز انسانی در سه سویه از سیستم باکتریایی *E. coli* بنام های BL21, Shuffle T7 و NICO21، انواع غلظت IPTG و بیان آنزیم را در OD های مختلف از روش سطح پاسخ RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) برای پیش بینی متغیرهای مستقل بر میزان بیان آنزیم انتروکیناز استفاده نمودند و به این نتایج دست یافتند که نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۱/۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۰/۷۲ میلی مولار و نوع سویه باکتری ShuffleT7 بود که بیشترین بیان آنزیم مشاهده گردید (۲۴). که در این مطالعه نقطه مرکزی دارای شرایط میزان OD برابر با ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، غلظت IPTG ۱ میلی مولار و نوع محیط کشت LB برای بیان بیشتر پروتئین رومیپلاستیم حاصل شد. پکی ام و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه ای به بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب در اشرشیاکلی با استفاده از رویکردهای محاسباتی و تجربی پرداختند. آن ها معتقد بودند که کاربرد همه روش های بهینه سازی به ترتیب برای همه فاکتورهای حیاتی در سطح بیان و فرآیند می تواند منجر به بازده بالای پروتئین نوترکیب شود (۳۷) که در این مطالعه نیز استفاده از روش RSM به عنوان ابزارهای محاسباتی مناسب از ویژگی های تأثیرگذار است که بهینه سازی عوامل مبتنی

بر ژن و پروتئین، شناسایی سطوح بهینه تمام فاکتورهای فرآیندی انتخابی را تسهیل می کند. در نتیجه چنین سیستم پیشرفته ای قادر به پیش بینی عملکرد پروتئین در اشرشیاکلی نوترکیب بوده و آزمایشات آزمایشگاهی را بیشتر کاهش خواهد داد. پوری در سال ۲۰۲۲ به اتفاق همکاران، طراحی کیفیت فرایند پروسه خالص سازی رومیپلاستیم را مورد بررسی قرار دادند. آن ها با در نظر گرفتن سه پارامتر pH، زمان انکوباسیون و نسبت سیستم/سیستین در مرحله ریفولد بهینه سازی انجام دادند. آن ها دست یافتند که در pH قلیایی افزایش پیوند دی سولفیدی بیشتر بوده و روی تاخوردگی مجدد پروتئین تأثیر مثبت خواهد داشت. نتایج آن ها اینگونه بود که با pH=8، نسبت سیستم به سیستم ۵/۰ و زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت، بازده تاخوردگی مجدد پروتئین به ۸۵ درصد رساندند و برای حذف ناخالصی ها از کروماتوگرافی HIC استفاده نمودند (۳۸). نتایج مطالعه ما اینگونه بود که پس از تولید و جدا سازی IB از باکتری های نوترکیب، در اوره ۸ مولار و DTT حل شد و در حضور افزودنی های آرژنین، سوربیتول، تریس ریفولد شدند. نتایج بهینه Refolding در pH ۶ و نسبت ۱ سیستم به سیستم و DTT ۱۰ میلی مولار حاصل شد. خالص سازی را بر اساس patent Amgen با رزین Sp sepharose انجام شد. هاشم زایی و همکاران در سال ۲۰۲۳، در مطالعه ای با عنوان بیان پروتئین و خالص سازی رومیپلاستیم و تجزیه و تحلیل تولید ترشعی آن با استفاده از شیه سازی و بررسی سیگنال پپتید آن در باکتری اشرشیاکلی، آن ها توالی نوکلئوتیدی رومیپلاستیم را برای بیان در سویه BL21 بهینه و برای تجزیه و تحلیل اثر سیگنال پپتید pelB از پلاسمیدهای pET-22b(+) و pET-15b استفاده نمودند (۳۹). که پلاسمید مورد استفاده این مطالعه از نوع pET9a است. این وکتور دارای مارکر انتخابی کانامایسین و پروموتور T7 می باشد که از پلاسمید دیگری استفاده شد.

رضوی پور و همکاران در سال ۲۰۲۲، در مطالعه ای با عنوان نقش مهار آنزیم فورمات دهیدروژناز در رشد باکتری صنعتی BL21، با بررسی مسیرهای متابولیکی مستند شده در وبگاه KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) با دیدگاه کاهش راندمان تولید CO₂ از اسید فرمیک بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد در محیط LB، موتان باکتری های اشرشیاکلی نسبت به BL21 از رشد بیشتری برخوردارند، که این تفاوت در محیط M9 بارزتر بود (۴۰). در این مطالعه نیز در محیط کشت LB بیشترین بیان پروتئین رومیپلاستیم نسبت به M9 مشاهده گردید. رانا و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه ای به بررسی ریفولディング پروتئین رومیپلاستیم با استفاده از گروماتوگرافی پرداختند. آن ها به این نتیجه دست یافتند که ریفولدینگ مجدد در شرایط بهینه، حداکثر

کاربردهای بالینی داروی رومیپلاستیم می‌توان به کنترل پلاکت در بیماران مبتلا به اختلالات پلاکتی اشاره نمود. همچنین پیشنهاد می‌گردد برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب حتماً از روش‌های بهینه‌سازی برای فاکتورهای OD، IPTG، محیط کشت و سلول میزبان استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

از شرکت تحقیقاتی تولیدی آریا تینا ژن به خاطر فراهم نمودن امکانات و تجهیزات مناسب جهت انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می‌گردد.

حمایت مالی

این مطالعه تحت حمایت مالی شرکت تحقیقاتی تولیدی آریا تینا ژن انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه هیچ‌گونه ملاحظه اخلاقی ندارد.

بازده را $1/5 \pm 57$ درصد و خلوص بیش از $3/4 \pm 79/73$ درصد در رقت ۲۵ برابری در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌دهد (۴۱). در این مطالعه نیز ما از فرآیند ری‌فولدینگ برای بازده بیشتر و خلوص‌سازی بهتر استفاده نمودیم.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه کلونینگ و بهینه‌سازی شرایط بیان ژن و خلوص‌سازی پپتیدی رومیپلاستیم در سویه BL21 از باکتری اشرشیا کلی صورت گرفت. بهترین OD برای بیان رومیپلاستیم $0/8$ ، بهترین غلظت IPTG که بیشترین بیان را برای رومیپلاستیم فراهم نمود، غلظت ۱ میلی‌مولار و بهترین محیط کشت مورد بررسی در این مطالعه، محیط کشت LB بود. همچنین برای شروع فرآیند خلوص‌سازی ابتدا مرحله ری‌فولدینگ صورت گرفت، به دلیل اینکه پروتئین به نحو صحیح فولد گردد، در ادامه از ستون‌های sp-sepharose برای اتمام مراحل خلوص‌سازی استفاده گردید. با استفاده از نتایج چنین تحقیقاتی، پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس وسیع و با خلوص زیاد (تولید صنعتی)، تولید خواهد شد که می‌تواند منجر به خودکفایی در صنعت داروسازی نوترکیب شود. از

References:

1. Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, Pullarkat V, Gernsheimer TB, Senecal FM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371(9610):395–403. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60203-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60203-2).
2. Jamali F, Lemery S, Ayalew K, Robottom S, Robie-Suh K, Rieves D, et al. Romiplostim for the treatment of chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Oncology (Williston Park)* 2009;23(8):704–9.
3. Waknine Y. FDA Approvals: omacor, nuflexxa, combunox, and others. *Medscape Today*: <http://www.medscape.com/viewarticle/495709>. Última Visita 2004;18.
4. Mareddy C, Kalra M, Sachdeva A. Generic romiplostim for children with persistent or chronic immune thrombocytopenia: Experience from a tertiary care centre in North India. *Br J Haematol* 2022;197(5):618–26. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.18126>.
5. Nicholl DST. An Introduction to Genetic Engineering. In: *An Introduction to Genetic Engineering*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 1–1.
6. Farrukh S, Fan X, Mustafa K, Hussain A, Ayoub M, Younas M. Nanotechnology and the generation of sustainable hydrogen. *Springer Nature*; 2020.
7. Bussel JB, Soff G, Balduzzi A, Cooper N, Lawrence T, Semple JW. A review of romiplostim mechanism of action and clinical applicability. *Drug Des Devel Ther* 2021;15:2243–68. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S299591>.
8. Nishida T, Yamaguchi M, Tatara Y, Kashiwakura I. Proteomic changes by radio-mitigative

- thrombopoietin receptor agonist romiplostim in the blood of mice exposed to lethal total-body irradiation. *Int J Radiat Biol* 2020;96(9):1125–34. <http://dx.doi.org/10.1080/09553002.2020.1787546>
9. Piccin A, Amadii G, Natolino F, Billio A, Cortelazzo S. Idiopathic thrombocytopenic purpura resistant to eltrombopag, but cured with romiplostim. *Blood Transfus* 2014;12 Suppl 1:s149-50. <http://dx.doi.org/10.2450/2013.0289-12>.
 10. Yang AS. Development of romiplostim: a novel engineered peptibody. *Semin Hematol* 2015;52(1):12–5. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.10.007>.
 11. Ghanima W, Cooper N, Rodeghiero F, Godeau B, Bussel JB. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later. *Haematologica* 2019;104(6):1112–23. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2018.212845>.
 12. Nurden P, Kessler Cm S, Ma L, Ha S. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Commentary* 2008; (9610).
 13. Al-Samkari H, Nagalla S. Efficacy and safety evaluation of avatrombopag in immune thrombocytopenia: analyses of a phase III study and long-term extension. *Platelets* 2022;33(2):257–64. <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2021.1881952>
 14. Cwirla SE, Balasubramanian P, Duffin DJ, Wagstrom CR, Gates CM, Singer SC, et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* 1997;276(5319):1696–9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5319.1696>.
 15. Shimamoto G, Gegg C, Boone T, Quéva C. Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies. *MAbs* 2012;4(5):586–91. <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.21024>.
 16. Ning L, Li Z, Bai Z, Hou S, He B, Huang J, et al. Computational design of antiangiogenic peptibody by fusing human IgG1 fc fragment and HRH peptide: Structural modeling, energetic analysis, and dynamics simulation of its binding potency to VEGF receptor. *Int J Biol Sci* 2018;14(8):930–7. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.24582>.
 17. Fayaz S, Fard-Esfahani P, Golkar M, Allahyari M, Sadeghi S. Expression, purification and biological activity assessment of romiplostim biosimilar peptibody. *Daru* 2016;24(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s40199-016-0156-7>.
 18. Zurawa-Janicka D, Wenta T, Jarzab M, Skorko-Glonek J, Glaza P, Gieldon A, et al. Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases. *Arch Biochem Biophys* 2017;621:6–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2017.04.004>.
 19. Tariq F, Khan MAU, Shahzad S, Chaudhary WB, Arif A, Gharib G. Production of Remedial Proteins through Genetically Modified Bacteria. *Adv Life Sci* 2018;5(2):37–45.
 20. Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen M-S, Logger L, Douzi B, et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(8):1664–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018>.
 21. Lim J. Destabilizing single chain major histocompatibility complex class I protein for repurposed enterokinase proteolysis, 2020. *Sci Rep* 10:1–10.
 22. Odonkor ST, Addo KK. Prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources. *Int J Microbiol* 2018;2018:7204013. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/7204013>.
 23. Melicherová K, Krahulec J, Šafránek M, Lišková V, Hopková D, Szélieová D, et al. Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*.

- Appl Microbiol Biotechnol 2017;101(5):1927–34.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7960-3>.
24. Ebrahimifard M, Forghanifard MM, Yamchi A, Zarrinpour V, Sharbatkhari M. A simple and efficient method for cytoplasmic production of human enterokinase light chain in *E. coli*. *AMB Express* 2022;12(1):160.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13568-022-01504-9>.
 25. Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 2015;80:6–7.
 26. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(1):21–39. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2399>.
 27. Giuliano KA, Wachi S, Drew L, Dukovski D, Green O, Bastos C, et al. Use of a high-throughput phenotypic screening strategy to identify amplifiers, a novel pharmacological class of small molecules that exhibit functional synergy with potentiators and correctors. *SLAS Discovery: Advancing Life Sciences R&D*. 2018;23:111–21.
 28. Gupta SK, Shukla P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2016;36(6):1089–98.
<http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>
 29. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J* 2012;7(5):620–34.
<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201100155>.
 30. Yusibov VM, Mamedov TG. Plants as an alternative system for expression of vaccine antigens. *Proc ANAS* 2010;65:195–200.
 31. Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13(4):947–61.
<http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2016.1260795>
 32. Criscuolo E, Caputo V, Diotti RA, Sautto GA, Kirchenbaum GA, Clementi N. Alternative methods of vaccine delivery: An overview of edible and intradermal vaccines. *J Immunol Res* 2019;2019:8303648.
<http://dx.doi.org/10.1155/2019/8303648>.
 33. Molineux G. The development of romiplostim for patients with immune thrombocytopenia: Romiplostim for ITP. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1222(1):55–63.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05975.x>.
 34. Koolivand D, Bashir NS, Behjatnia SA, Joozani RJ. Production of Polyclonal Antibody against Grapevine fanleaf virus Movement Protein Expressed in *Escherichia coli*. *Plant Pathol J* 2016;32(5):452–9.
<http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2016.0031>.
 35. Raikhy G, Hallan V, Kulshrestha S, Zaidi AA. Polyclonal Antibodies to the Coat Protein of Carnation etched ring virus Expressed in Bacterial System: Production and Use in Immunodiagnosis. *J Phytopathol* 2007;155(10):616–22.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01287.x>.
 36. Abdollahzadeh R, Pazhang M, Najavand S, Fallahzadeh-Mamaghani V, Amani-Ghadim AR. Screening of pectinase-producing bacteria from farmlands and optimization of enzyme production from selected strain by RSM. *Folia Microbiol (Praha)* 2020;65(4):705–19.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12223-020-00776-7>.
 37. Packiam KAR, Ramanan RN, Ooi CW, Krishnaswamy L, Tey BT. Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*

- 2020;104(8):3253–66.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10454-w>.
38. Pouri S, Torkashvand F, Aghamirza Moghim Aliabadi H, Fard-Esfahani P, Golkar M, Vaziri B. Quality by design in downstream process development of romiplostim. *Iran Biomed J* 2022;26(6):414–25.
<http://dx.doi.org/10.52547/ibj.3790>.
39. Hashemzaei M, Negahdaripour M, Heidari R, Ghoshoon MB. Protein expression and purification of Romiplostim and analysis of its secretory production using an in silico investigated signal peptide in *E. coli*. *Rep Biochem Mol Biol* 2023;12(1):27–35.
<http://dx.doi.org/10.52547/rbmb.12.1.27>.
40. Razavipour R, Sepahi AA, Modarressi MH, Bambai B. Inhibitory role of formate dehydrogenase enzyme in the growth of BL21 industrial bacteria. *New Cell Mol Biotech J* 2022;12(46):65–74.
41. Rana S, Ughade S, Kumthekar R, Bhambure R. Chromatography assisted in-vitro refolding and purification of recombinant peptibody: Recombinant Romiplostim a case study. *Int J Biol Macromol* 2023;249:126037.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126037>.

OPTIMIZATION OF PRODUCTION OF RECOMBINANT ROMIPLASTIM PEPTIBODY IN *ESCHERICHIA COLI*

Saleh Shahbazi Azar¹, Seyed Hasan Hasani Kumle^{2*}, Ahad Yamchi³, Majid Shahbazi⁴

Received: 22 August, 2023; Accepted: 06 November, 2023

Abstract

Background & Aim: Romiplastim is a fusion protein that has the same function as thrombopoietin in the body and thereby, stimulates bone marrow to produce more platelets. Thrombopoietin is a hormone that controls the production of platelets. Romiplastim is used in the treatment of thrombocytopenia in patients with chronic immune thrombocytopenia (ITP) when other drugs like corticosteroids and immunoglobulins or splenectomy have not treated them. The aim of this study was cloning and optimization of gene expression conditions and purification of recombinant Romiplastim peptibody in *Escherichia coli* bacteria.

Materials & Methods: In this practical study, the independent variables used included the amount of ODs (0.4, 0.8 and 1.2) at a wavelength of 600 nm, IPTG concentration (0.5, 1 and 1.5 mM) and the type of culture medium (LB, TB, M9). The Response Surface Methodology (RSM) was used in the form of central composite design with Design-Expert 12 software to predict independent variables on the amount of romiplastim production.

Results: OD equal to 0.8, IPTG concentration equal to 1 mM and LB culture medium were optimized for the production of recombinant Romiplast peptibody.

Conclusion: Since the optimal production of peptibody was desired, cloning and optimization of conditions of gene expression and purification of Romiplastim peptibody in BL21 strain of *Escherichia coli* bacteria were done with the most optimal conditions which were done by RSM. Also, for correct folding of the protein, the refolding step was used at the beginning of the purification. Medicinal proteins play an important role in modern molecular medicine treatments.

Keywords: Cloning, Optimization, Peptibody, Purification, Romiplastim

Address: Gilan Province, Rasht, Gilan University, Department of Agricultural Biotechnology

Tel: +981734533518

Email: kumleh@guilan.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(9): 534 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ PhD student in Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, University of Guilan, Rasht, Iran

² Associate Professor of Agricultural Biochemistry and Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (Corresponding Author)

³ Associate Professor of Genetic Engineering, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁴ Professor of Immunology and Genetics, Department of Human Genetics, Faculty of Modern Technologies of Medical Sciences, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran