

بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در رشد باکتری *Escherichia coli* تولید کننده پروتئین نو ترکیب β NGF با استفاده از روش سطح پاسخ

پوریا غلامی تیلکو¹، زهرا حاجی حسن^{2*}، نوید نظری³، حمید مقیمی⁴

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران

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

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

4- استادیار بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران

* تهران، صندوق پستی 1561-14395

hajihasan@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/10/13 پذیرش مقاله: 95/1/31)

چکیده- تولید پروتئین‌های نو ترکیب در میزبان باکتریایی *E. coli* در چند دهه اخیر بسیار رواج پیدا کرده است. مطالعات و آزمایش‌های بسیار زیادی در زمینه بهینه‌سازی و افزایش تولید و بیان پروتئین‌های نو ترکیب در این میزبان انجام گرفته است. از راه‌های افزایش تولید، رسیدن به تراکم بالای سلولی (افزایش غلظت سلولی) و تولید بیشتر پروتئین‌های داخل سلولی از جمله پروتئین نو ترکیب β -NGF می‌باشد. بدین منظور در این پژوهش برای اولین بار با استفاده از گلیسرول و عصاره مخمر به عنوان منابع کربن و نیتروژن و همچنین نمک $MgCl_2$ به عنوان افزایش دهنده رشد، کشت باکتری در تراکم سلولی بالا انجام شد. همچنین تأثیر شرایط کشت شبانه بر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بهینه شرایط با استفاده از روش سطح پاسخ به دست آمد که شامل غلظت 23/18 گرم بر لیتر گلیسرول، غلظت 44/14 گرم بر لیتر عصاره مخمر و غلظت 10 mM نمک $MgCl_2$ می‌باشد. همچنین کشت 14 ساعته در دمای 37 درجه سانتی گراد و دور شیکر 180 rpm به عنوان شرایط بهینه رشد معرفی شد. این مطالعه نشان داد که میزان رشد سلولی و تولید پروتئین نو ترکیب β -NGF در شرایط بهینه شده نسبت به محیط کشت پایه افزایش قابل توجهی داشته است.

کلیدواژگان: گلیسرول، عصاره مخمر، روش سطح پاسخ، کشت شبانه، $MgCl_2$.

1- مقدمه

شناخته شده‌ترین عضو خانواده نوروتروفین‌ها³، شناسایی شد. به علاوه این پروتئین یک هورمون (با مثال‌هایی از فعالیت‌های اتوکرینی⁴ روی سلول‌های B) نیز به حساب می‌آید که اثرگذاری آن را روی سلول‌های غیرعصبی نشان

فاکتور رشد عصبی¹ 50 سال قبل به عنوان پروتئینی که قابلیت تمایز²، بقا، رشد و حفاظت از سلول‌های عصبی مرکزی و محیطی را دارد و همچنین به عنوان

³ Neurotrophins

⁴ autocrine

¹ Nerve Growth Factor

² Differentiation

ورزی آسان، به عنوان اصلی ترین مزیت *E. coli* برای بیان پروتئین های نو ترکیب شناخته شده است [12]. تعدادی از عوامل تأثیرگذار در بازده نهایی تولید پروتئین نو ترکیب، ترکیب محیط کشت، زمان القاء پروموتور و تولید اسید استیک می باشد. کشت باکتری *E. coli* در تراکم سلولی بالا در شیک فلاسک با استفاده از محیط ها و غلظت های مختلف IPTG³ برای تولید پروتئین های متنوعی گزارش شده است [13].

ترکیبات محیط کشت سلول باید به دقت فرموله شده و تحت نظارت باشد، زیرا ممکن است اثرات متابولیکی قابل توجهی هم روی رشد سلول و هم در تولید پروتئین داشته باشد [14]. بنابراین، هدف از این مطالعه بهبودسازی محیط کشت به منظور دستیابی به رشد سلولی بیشتر و بیان بالاتر پروتئین نو ترکیب β-NGF در میزبان *BL21(DE3)* *E. coli* می باشد.

2- مواد و روش ها

2-1- تهیه محیط کشت

از محیط LB broth به همراه 1% کانامایسین به عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. محیط کشت تهیه شده برای رشد باکتری ها، شامل گلیسرول به عنوان منبع کربن (شرکت *biobasic*) و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن (شرکت *QUELAB*) است که با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)⁴ غلظت های این دو منبع بررسی شدند. همچنین به هریک از غلظت ها 5 g/l NaCl و 10mM MgCl₂ (ضروری برای رشد در ترکم سلولی بالا) افزوده و با استفاده از آب مقطر به حجم رسانده شدند. در پایان pH همه نمونه ها بین 7/4-7/6 تنظیم گردید.

2-2- سویه باکتری و وکتور pET39b(+)

در این پژوهش از سویه *E. coli BL21(DE3)* (میزبان

می دهد [1]. غدد بزاقی موش نر بالغ به عنوان یکی از منابع طبیعی غنی از NGF شناخته شده که شباهت زیادی به NGF انسانی دارد [2].

ثابت شده است که پروتئین NGF در مدل های حیوانی با بیماری های تخریب عصبی، روند تخریب نورون ها را کاهش داده یا از بین می برد [3]. همچنین این پروتئین تولید اعصاب محیطی در موش صحرایی را تقویت کرده و باعث بازگشت حافظه تخریب شده ی موش های صحرایی پیر می شود [4،5]. به علاوه این پروتئین عملکرد حافظه ی تخریب شده ی موش های صحرایی جوان بالغ را نیز بهبود می بخشد [6]. پروتئین NGF در درمان التهاب ناشی از بیماری های خود ایمن مغزی مثل مالتیپل اسکلروزیس¹ از طریق بازسازی غلاف میلینی اطراف اکسون ها ایفای نقش می کند [7]. مهم ترین عملکرد NGF در تمایز سلول های بنیادی نوروئی و در درمان بیماری های عصبی مثل آلزایمر² است [8]. علاوه بر ایفای نقش در تمایز سلول های عصبی این پروتئین نقش های ثانویه دیگری نیز دارد که از میان آن ها می توان به التیام بخشدن زخم ها در موش های سالم و مبتلا به دیابت و درمان بیماری های مربوط به قرنیه ی چشم اشاره کرد [9،10].

با توجه به عملکرد فاکتورهای رشد متعلق به خانواده ی نوروتروفین ها مثل NGF بر روی تکثیر، تمایز، بقا و مرگ سلول های عصبی و با توجه به این مسئله که به دست آوردن مقادیر زیادی از این پروتئین از منابع طبیعی اش کار مشکل، زمان بر و پرهزینه ای است، توجه محققان به سمت تولید نو ترکیب این پروتئین در میزبان های مختلف معطوف شد [11].

کاربرد بسیار گسترده، سرعت و بازده بالای بیان، سیستم های متنوع برای بیان پروتئین های نو ترکیب، ژنتیک شناخته شده، نرخ رشد بالا، کشت ارزان و امکان دست

³ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

⁴ Response surface methodology (RSM)

¹ Multiple Sclerosis

² Alzheimer's Disease

2-6- بیان پروتئین نو ترکیب β -NGF انسانی در سویه‌ی باکتریایی *BL21(DE3)* و تأیید آن با استفاده از تکنیک دات بلات³

میزان 1% از کشت شبانه‌ی سویه‌ی *E. coli BL21(DE3)* دارای وکتور pET39b:: β NGF به صورت جداگانه در محیط LB و محیط کشت بهینه شده توسط روش سطح پاسخ حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. پس از رسیدن OD به 0/6 در طول موج 600 نانومتر القا توسط 1 میلی مولار IPTG صورت گرفت و پس از اتمام مدت زمان بیان، سلول‌ها در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و جمع‌آوری شدند. سپس کل محتوای پروتئینی تولید شده توسط افزودن اوره 8 مولار (شرکت Merck آلمان) استخراج گردید. نمونه‌های پروتئینی استخراج شده روی کاغذ نیترو سلولز (شرکت Millipore آمریکا) لکه‌گذاری شدند و کاغذ توسط بافر بلوکه کننده‌ی TBS-T (Tris-HCl, NaCl, Tween20) بلوکه شد. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی بادی مونوکلونال ضد His-tag متصل به آنزیم HRP⁴ (شرکت Sigma آمریکا) با رقت 1:1000 مورد استفاده قرار گرفت. در پایان، کاغذ با سوپسترای رنگی DAB (شرکت Biobasic کانادا) در حضور پر اکسید هیدروژن به عنوان سوپسترای آنزیم در محیط تاریک انکوبه شد.

3 - نتایج

3-1- تحلیل داده‌های حاصل از بهینه‌سازی شرایط کشت شبانه

مدت زمان، دما و دور شیکر کشت شبانه در میزان رشد سلولی کشت اصلی مؤثر می‌باشد. نمودار رشد باکتری با تأثیر این عوامل رسم گردید (شکل 1).

باکتریایی ترانسفورم شده با وکتور pET39b(+) (ناقل بیانی) خریداری شده از شرکت *Nova gene* آمریکا استفاده شد.

2-3- شرایط کشت شبانه

به منظور تهیه کشت شبانه یک کلونی تک به محیط کشت LB تلقیح شد و سوسپانسیونی تهیه و به تمامی نمونه‌ها مقدار یکسانی تلقیح شد. به منظور بررسی تأثیر مدت زمان و شرایط کشت شبانه بر رشد سلولی، کشت شبانه در زمان‌ها (10، 12، 14، 16 ساعت) و شرایط مختلف (دور شیکر 150 و 180 rpm - دمای 25 و 37 درجه سانتی گراد) انجام گرفت.

2-4- بررسی رشد (تراکم سلولی¹)

تمامی آزمایش‌ها در ارلن‌های 100 میلی لیتری حاوی 20 میلی لیتر محیط کشت انجام شدند. به هر محیط کشت 1% حجمی حجمی تلقیح از کشت شبانه صورت گرفت و نمونه‌ها در شیکر انکوباتور با دمای 37 درجه و دور شیکر 180 rpm قرار داده شدند. به منظور بررسی رشد، در فواصل زمانی معین جذب تمامی نمونه‌ها در طول موج 600nm به وسیله دستگاه UV-Vis Spectrophotometer (Thermo ساخت آمریکا) قرائت شد و نمودار رشد آن‌ها رسم گردید.

2-5- طراحی آزمایش CCD²

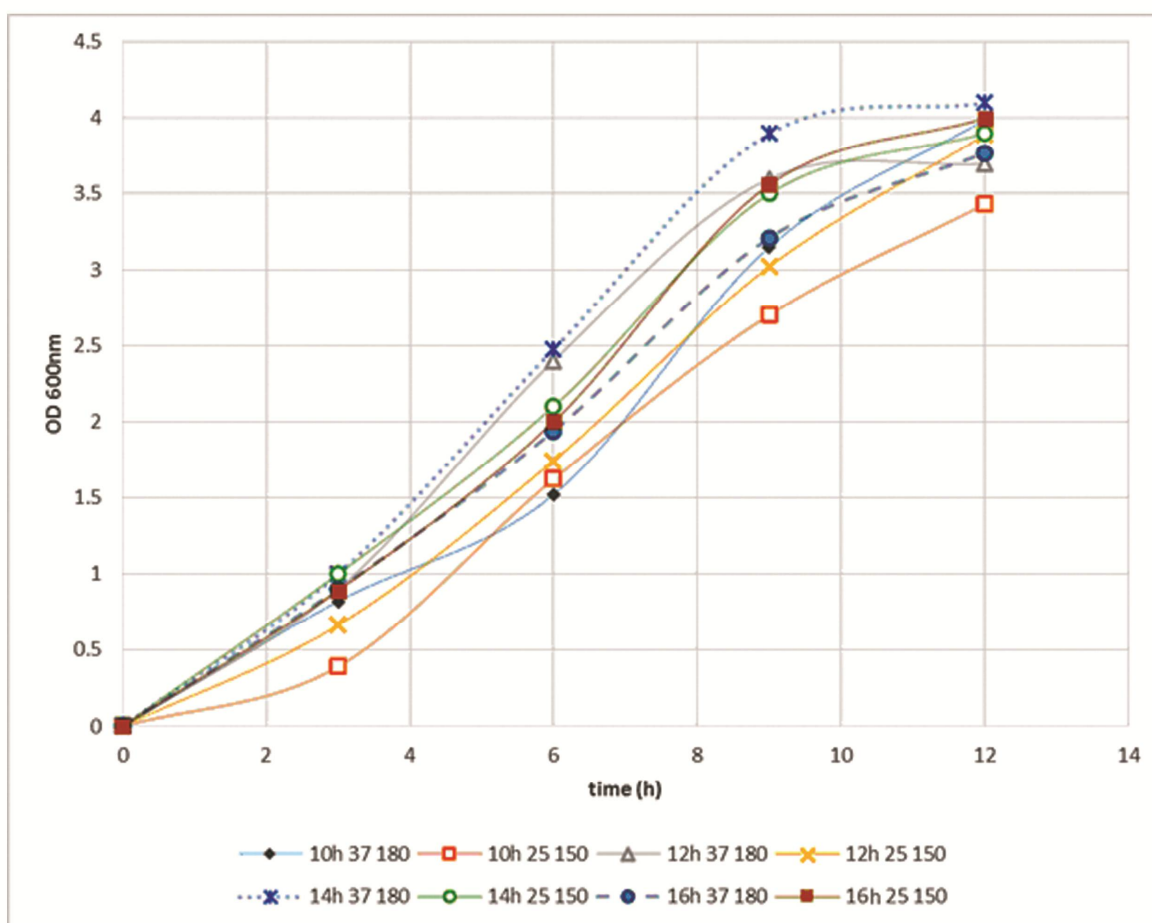
در این پژوهش برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی میزان منابع کربن و نیتروژن محیط، از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) توسط نرم افزار (Statease, DESIGN EXPERT 7/0USA) استفاده شد. همچنین با استفاده از منحنی برجسته، برهمکنش دو متغیر بر روی پاسخ مشخص شد.

³ Dot blot

⁴ Horse Radish Peroxidase

¹ Cell density

² Central composite design



شکل 1 نمودار رشد باکتری‌ها با شرایط کشت شبانه متفاوت (نتایج حاصل سه بار تکرار می‌باشد). نمودارها نشان دهنده تأثیر زمان‌های کشت (10، 12، 14، 16 ساعت)، دما (25، 37 درجه سانتی‌گراد) و دور شیکر متفاوت (180 و 150 rpm) بر منحنی رشد باکتری‌ها می‌باشد

از شکل مشاهده می‌شود رشد باکتری‌ها در حضور غلظت 10 mM نمک $MgCl_2$ به‌ویژه بعد از 4 ساعت نسبت به حالتی که نمک به محیط افزوده نشده است، بسیار سریع‌تر انجام می‌شود. لذا در بقیه مراحل کار $MgCl_2$ با غلظت 10 mM به محیط کشت باکتری‌ها افزوده شد.

3-3- تحلیل داده‌های حاصل از بهینه‌سازی محیط

کشت به روش RSM

از عوامل مؤثر در تولید کشت با تراکم سلولی بالا در *E. coli*، غلظت عصاره مخمر و گلیسرول (منبع کربن و نیتروژن) بوده که به‌عنوان فاکتورهای اصلی برای بهینه‌سازی انتخاب شدند و آزمایش‌ها مطابق روش CCD

همان‌طور که ملاحظه می‌شود نتایج نشان می‌دهد که کشت 14 ساعته در دمای 37 درجه و دور شیکر 180 rpm از نقطه نظر رشد سریع‌تر و تراکم سلولی بالاتر¹ (OD max) بهترین شرایط برای ادامه کار می‌باشد.

3-2- تأثیر $MgCl_2$ بر رشد باکتری

وجود نمک $MgCl_2$ برای رشد باکتری در تراکم بالا ضروری است. به‌منظور تأیید این ادعا، دو محیط کشت به صورت جداگانه شامل محیط کشت بهینه کامل و محیط کشت بهینه فاقد نمک تهیه و باکتری به آن تلقیح شد. نمودار رشد باکتری‌ها رسم گردید (شکل 2). همان‌طور که

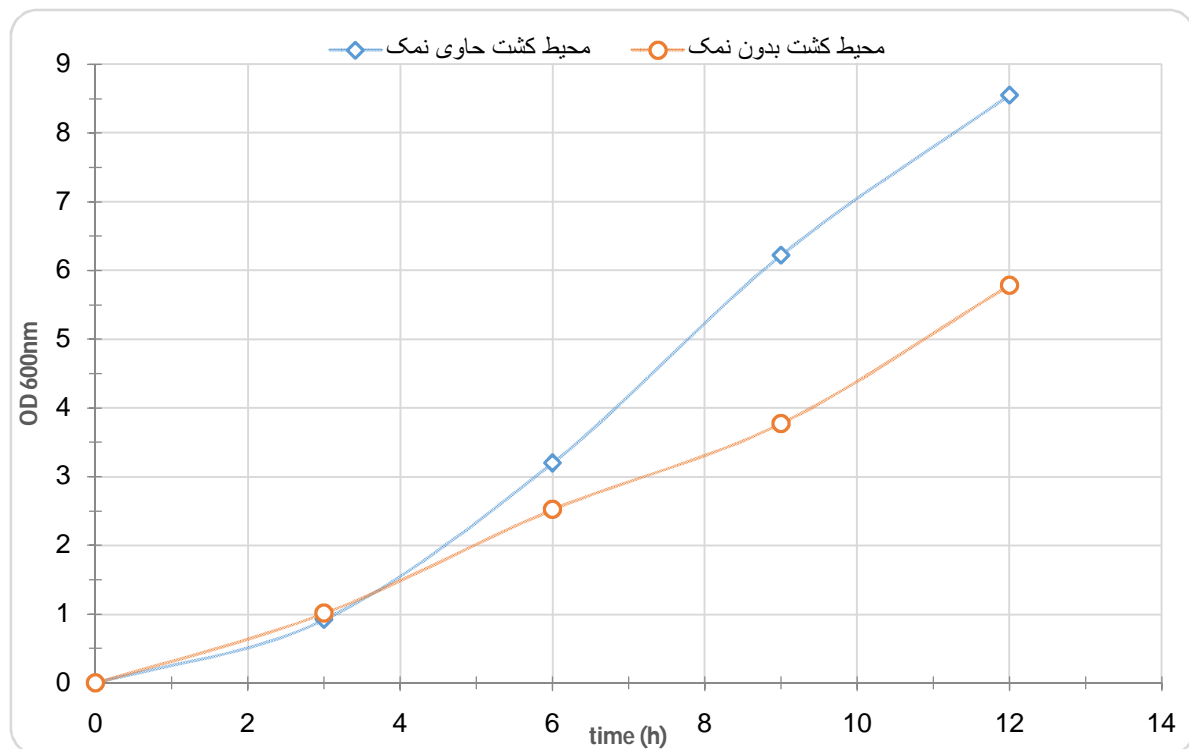
¹ High cell-density

(جدول 1).

مقدار p-Value برای تره‌های غلظت عصاره مخمر (A)، غلظت گلیسرول (B) و توان دوم غلظت عصاره مخمر (A^2) و حاصل ضرب غلظت عصاره مخمر در غلظت گلیسرول (AB) کمتر از 0/05 است، در نتیجه اهمیت این تره‌ها در تولید بهینه تراکم سلولی، قابل ملاحظه است.

سطح پاسخ برای این دو عامل در قالب 13 آزمایش با 5 نقطه مرکزی طراحی شد.

اثر هر دو متغیر و اثرات متقابل آن‌ها بر روی پاسخ از طریق انجام آزمایش‌ها در 5 سطح مختلف و به صورت غیر تصادفی برای هر دو متغیر مورد مطالعه قرار گرفتند. مقدار تراکم سلولی بالا (جذب 600nm) به عنوان پاسخ به کمک نرم افزار 7/0 EXPERT DESIGN آنالیز شد



شکل 2 منحنی رشد باکتری، در حضور و عدم حضور غلظت 10 mM نمک $MgCl_2$

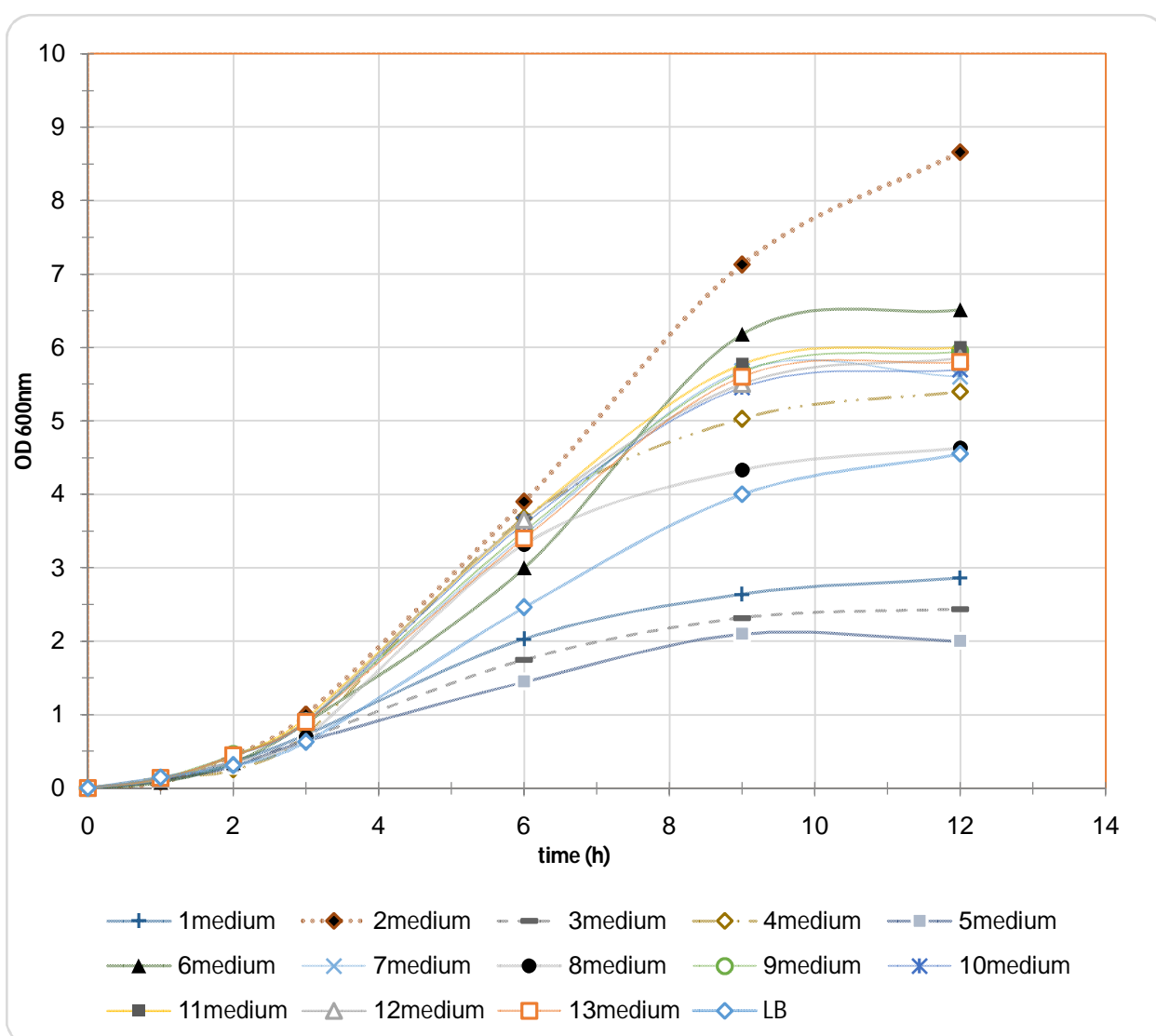
جدول 1 آنالیز انحراف معیار تراکم سلولی بالا

عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	F-Value	P-Value Probe>F
A	28/65	28/65	101/62	0/0001
B	3/19	3/19	11/32	0/0099
A^2	3/67	3/67	13/02	0/0069
B^2	0/77	0/77	3/66	0/0971
AB	2/02	2/02	7/15	0/0282

ترم B^2 با مقدار بالاتر از 0/05 توسط نرم‌افزار حذف می‌شود. همچنین مقدار $R\text{-Squared}$ (R^2)=0/9628 (ضریب تشخیص¹) برای معادله به‌دست‌آمده، نشان‌دهنده همپوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل ارائه‌شده برای تولید بهینه توده زیستی است.

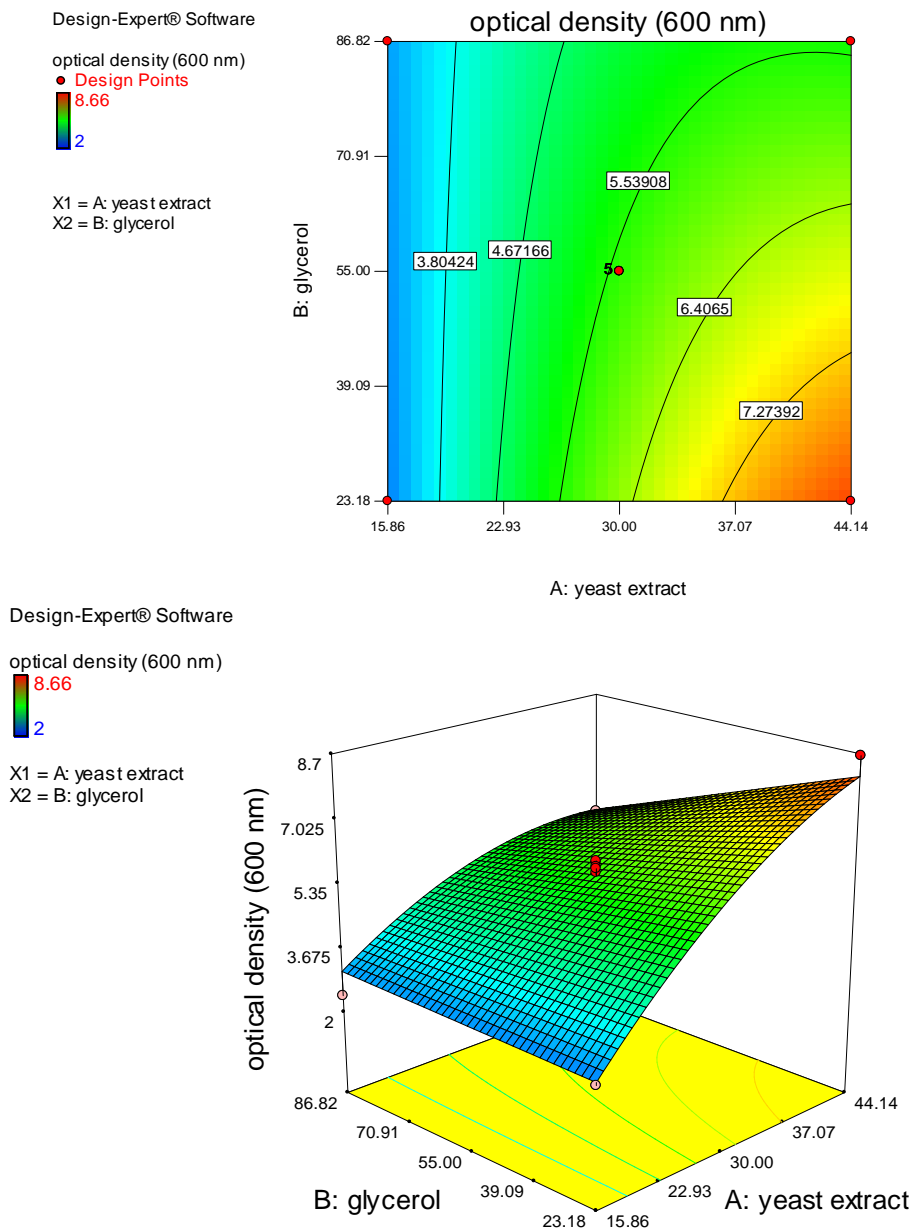
نتایج رشد سلول‌های باکتری در محیط‌های کشت تهیه شده، نشان می‌دهند که با افزایش غلظت نیتروژن (عصاره

مخمر) تا 44/14 گرم در لیتر تراکم سلولی افزایش می‌یابد و پس از آن افزایش غلظت تأثیری بر سرعت رشد ندارد، اما با بالا بردن میزان غلظت کربن (بیشتر از 23/18 گرم بر لیتر) تراکم سلولی کاهش می‌یابد. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان رشد در غلظت 44/14 گرم در لیتر عصاره مخمر و 23/18 گرم در لیتر گلیسرول دیده می‌شود (شکل‌های 3 و 4).



شکل 3 منحنی رشد باکتری‌ها در محیط کشت‌های حاوی مقادیر متفاوت گلیسرول و عصاره مخمر (نتایج حاصل سه بار تکرار می‌باشد)

¹ Coefficient of Determination



شکل 4 الف- نمایش دوبعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری (تراکم سلولی). ب- نمایش سه‌بعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری

(شکل 5).

ظهور لکه در هر دو نمونه نشان‌دهنده واکنش آنتی‌بادی ضد his-tag با پروتئین NGF تولید شده (حاوی دنباله پلی هیستیدین) می‌باشد. با مقایسه شدت رنگ لکه‌ها می‌توان به‌صورت تقریبی چنین استنباط کرد که میزان بیان در نمونه‌های کشت داده‌شده در محیط بهینه‌شده بیشتر از نمونه‌های کشت داده‌شده در محیط LB می‌باشد.

4-3- بررسی بیان

سویه باکتری *BL21(DE3)* که با وکتور pET39b::hNGF ترانسفورم شده است در غلظت 23/18 گرم در لیتر گلیسرول و 44/14 گرم در لیتر عصاره مخمر و 10mM نمک $MgCl_2$ کشت داده شد. از کشت باکتری در محیط LB نیز به‌عنوان کنترل استفاده گردید. با استفاده از تکنیک دات بلات صحت بیان ارزیابی شد



شکل 5 نتیجه آزمایش دات بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد his-tag. نمونه 1 پروتئین‌های استخراج‌شده از باکتری‌های کشت داده‌شده در محیط LB برات (نمونه کنترل) و نمونه 2 پروتئین‌های استخراج‌شده از باکتری‌های کشت داده‌شده در محیط کشت بهینه

4- بحث

تا سال 1982 که برای اولین بار انسولین انسانی نوترکیب با استفاده از باکتری *E. Coli* به تولید رسید، تنها منبع تولید پروتئین‌های دارویی از جمله فاکتورهای رشد و پروتئین‌های خونی مختلف، منابع طبیعی آن‌ها نظیر خون یا بافت‌های حیوانی بود. پس از آن نیز تولید نوترکیب پروتئین‌های دارویی قابل تولید، اغلب به میزان بسیار اندک و با هزینه بسیار بالایی انجام می‌شد [15].

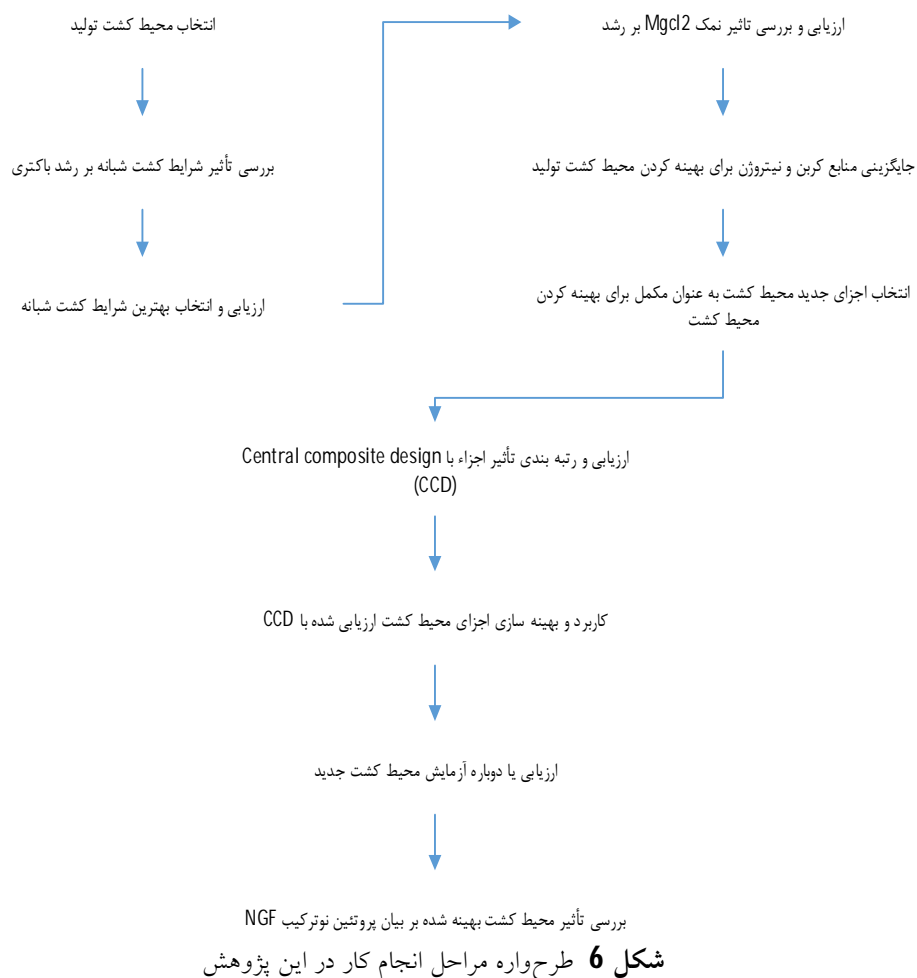
بهینه‌سازی شرایط رشد، تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* را به میزان قابل توجهی افزایش خواهد داد که از آن جمله می‌توان به استفاده از سیستم‌های کشت سلولی با چگالی بالا که می‌تواند غلظت سلول را به بیش از 100 گرم ماده خشک در یک لیتر برساند، اشاره کرد. همچنین مطالعات متعددی در مورد سیستم‌های تخمیر انجام‌شده است که نشان می‌دهند ترکیب مواد مغذی و متغیرهای تخمیر مانند دما و pH می‌تواند در ترجمه mRNA، فعالیت پروتئولیتیک، ترشح و سطح تولید پروتئین نوترکیب تأثیرگذار باشند [16]. دست‌کاری‌های خاصی در محیط کشت به منظور ارتقاء انتشار پروتئین به محیط بیرون بدون ایجاد لیز سلولی نیز انجام شده است. با این وجود، سیستم‌های کشت سلولی با چگالی بالا از اشکالات متعددی از جمله: در دسترس بودن محدود اکسیژن محلول در تراکم سلولی بالا و سطح بالای دی‌اکسید کربن که می‌تواند باعث کاهش نرخ رشد و

تحریک تشکیل استات شود برخوردار می‌باشند [18، 17]. چاپرون‌ها ترکیبات شیمیایی با وزن مولکولی کم هستند، از جمله گلیسرول، که برای جلوگیری از تشکیل تجمع اینکلوزن بادی‌ها در طول فولدینگ در آزمایشگاه استفاده می‌شوند. گلیسرول با توجه به گسترش تعاملات آب‌گریز می‌تواند به‌عنوان تثبیت‌کننده واسطه‌های فولدینگ پروتئین، عمل کند [20، 19]. در یک گزارش از Savari و همکاران اثرات چاپرون‌های شیمیایی مانند گلیسرول و اتانول در تولید هورمون رشد نوترکیب در محلول مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج آن تأیید می‌کنند که گلیسرول باعث افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب هورمون رشد در *E. coli* شده است [21]. به‌تازگی، مطالعات آزمایشگاهی در سلول‌های ترانسفکت شده نشان داده است که گلیسرول می‌تواند فولدینگ اشتباه دلتا F508 CFTR در سیستمیک فایبروزیس را از طریق ایجاد یک واسطه، تصحیح کند [22].

به علاوه گلیسرول چاپرون شیمیایی است که به‌عنوان عنصر حفاظتی برای پروتئین در برابر دناتوره شدن توسط افزایش هیدراتاسیون نسبی در اطراف پروتئین عمل می‌کند. در مطالعه Leandro و همکاران نشان داده شده است که گلیسرول به‌عنوان یک مراقب شیمیایی باعث افزایش تولید و عملکرد آنزیم موتانت فنیل آلانین هیدروکسیلاز می‌شود [20]. در تحقیقات Lin و همچنین Cao و همکاران نشان داده شده است که گلیسرول با

مطالعه نشان داده شد که در محیطی که تنها یون منیزیم حضور دارد، در غلظت‌های پایینتر از 10 mM از یون Mg^{+2} ریبوزوم‌ها غیر فعال خواهند شد [27]، لذا در مطالعه حاضر، با توجه به حضور یون‌ها و نمک‌های دیگری در محیط (بطور مثال NaCl) تأثیر یون منیزیم بر رشد مورد بررسی قرار گرفت، و از همان غلظت مورد اشاره در مقالات یعنی 10 میلی مولار استفاده گردید. بنابراین در این پژوهش پس از بررسی میزان تأثیر یون منیزیم، از عصاره مخمر به عنوان منبع اصلی نیتروژن اضافی و از گلیسرول به عنوان منبع کربن و چاپرون شیمیایی برای بهبود فولدینگ پروتئین استفاده شد. لازم به ذکر است که کل مراحل انجام کار در این پژوهش در فلوچارت ترسیم شده در شکل 6 به نمایش گذاشته شده است.

توجه به اثراتش بر سوخت‌وساز سلول به عنوان منبع کربن نیز استفاده می‌شود [23، 24]. گزارش‌های بسیاری نیز نشان می‌دهد که عصاره مخمر اغلب به عنوان منبع ازت اضافی برای بهبود بیان پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است [25، 26]، که البته با توجه به غنی بودن، به عنوان منبع کربن نیز در نظر گرفته می‌شود [24]. به علاوه افزودن نمک‌هایی چون $MgCl_2$ به محیط کشت نیز بی‌تأثیر نمی‌باشد بطوریکه سلول‌های باکتری در عدم حضور $MgCl_2$ رشد کندتری دارند و برای رسیدن به تراکم سلولی بالا افزودن یون منیزیم ضروری می‌باشد. علاوه بر این، در مطالعه ای که در سال 2014 توسط Nierhaus انجام شد به نقش بسیار موثر یون منیزیم در پروتئین‌سازی اشاره شده است. در این



- binding proteins (kallikreins) and an hypothetical structure of the high molecular weight complex of epidermal growth factor with its binding protein, *Protein Science* 2, 1229-1241.
- [3] Sahdev, S., Khattar, S. K., and Saini, K. S. (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies, *Molecular and cellular biochemistry* 307, 249-264.
- [4] Sun, W., Sun, C., Lin, H., Zhao, H., Wang, J., Ma, H., Chen, B., Xiao, Z., and Dai, J. (2009) The effect of collagen-binding NGF- β on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model, *Biomaterials* 30, 4649-4656.
- [5] Fischer, W., Sirevaag, A., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M., and Björklund, A. (1994) Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 8607-8611.
- [6] Jakubowska-Doğru, E., and Gümüşbaş, U. (2005) chronic intracerebroventricular NGF administration improves working memory in young adult memory deficient rats, *Neuroscience letters* 382, 45-50.
- [7] Althaus, H. H. (2004) Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins?, *Progress in brain research* 146, 415-432.
- [8] Heese, K., Low, J. W., and Inoue, N. (2006) Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease, *Neurosignals* 15, 1-12.
- [9] Kawamoto, K., and Matsuda, H. (2004) Nerve growth factor and wound healing, *Progress in brain research* 146, 369-384.
- [10] Lambiase, A., Sacchetti, M., and Bonini, S. (2012) Nerve growth factor therapy for corneal disease, *Current opinion in ophthalmology* 23, 296-302.
- [11] Bruce, G., and Heinrich, G. (1989) Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor, *Neurobiology of aging* 10, 89-94.
- [12] Sahdev, S., Khattar, S. K., and Saini, K. S. (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies, *Protein Science* 17, 1229-1241.
- نتایج بررسی حاضر نشان داد که با افزایش غلظت کرین تا 23/18 گرم بر لیتر رشد افزایش می‌یابد اما پس از آن افزایش غلظت منبع کرینی اثر مهاری بر رشد دارد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط دانشمندان دیگر نیز مطابقت دارد [۲۹،۲۸]. از طرف دیگر، با افزایش غلظت عصاره مخمر تا 44/14 گرم بر لیتر رشد افزایش می‌یابد و پس از آن افزایش بیشتر غلظت عصاره مخمر تأثیری بر روی رشد باکتری‌ها ندارد که این نتیجه در تحقیقات Yang و همکاران نیز به‌دست آمده بود [30].
- بنابراین بهترین شرایط محیط کشت غلظت 23/18 گرم بر لیتر گلیسرول، غلظت 44/14 گرم بر لیتر عصاره مخمر و غلظت 10 mM نمک $MgCl_2$ و 5 گرم بر لیتر NaCl می‌باشد که برای بیان پروتئین β NGF از آن استفاده شد. نتایج دات بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد his-tag تولید به میزان قابل قبولی را در نمونه‌های کشت داده‌شده در محیط بهینه نشان داد. شایان ذکر است که به‌منظور تأیید دقیق‌تر میزان تولید پروتئین تولیدی، مراحل خالص‌سازی و تعیین غلظت پروتئین الزامی می‌باشد.
- ### 5- سپاسگزاری
- تحقیق حاضر با حمایت مالی ستاد توسعه و علوم سلول‌های بنیادی تحت شماره طرح 11/25802 به سرپرستی دکتر زهرا حاجی حسن انجام شده است. همچنین نویسندگان از دانشگاه تهران به دلیل حمایت مالی به‌منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.
- ### 6- منابع
- [1] Levi-Montalcini, R. (1987) the nerve growth factor: 35 years later (Nobel lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English* 26, 707-716.
- [2] Bax, B., Ferguson, G., Blaber, M., Sternberg, M. J., and Walls, P. H. (1993) Prediction of the three-dimensional structures of the nerve growth factor and epidermal growth factor

- Chemistry 271, 635-638.
- [23] Lin, E. (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria, Annual Reviews in Microbiology 30, 535-578.
- [24] Cao, W., Li, H., Zhang, J., Li, D., Acheampong, D. O., Chen, Z., and Wang, M. (2013) Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study, Protein expression and purification 90, 55-66.
- [25] Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S., and Lee, J. (1997) Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3)[pET-3aT2M2], Biotechnology progress 13, 249-257.
- [26] Lee, C., Sun, W., Burgess, B., Junker, B., Reddy, J., Buckland, B., and Greasham, R. (1997) Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli*: effect of medium composition and induction timing on protein expression, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 18, 260-266.
- [27] Nierhaus, KH. (2014) Mg²⁺, K⁺, and the Ribosome, Journal of Bacteriology 196, 3817-3819.
- [28] جابری انصاری ف، حاجی حسن ز، جلیلی ح. (2015) تولید پروتئین نو ترکیب β -NGF در باکتری اشریشیا کلی با استفاده از شیرخه خرما، زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس 6، 60-70.
- [29] Vuillemin, M., Malbert, Y., Laguerre, S., Remaud-Siméon, M., and Moulis, C. (2014) Optimizing the production of an α -(1 \rightarrow 2) branching sucrose in *Escherichia coli* using statistical design, Applied microbiology and biotechnology 98, 5173-5184.
- [30] Yang, Y., Zhang, D., Liu, S., Jia, D., Du, G., and Chen, J. (2012) Expression and fermentation optimization of oxidized polyvinyl alcohol hydrolase in *E. coli*, Journal of industrial microbiology & biotechnology 39, 99-104.
- Molecular and cellular biochemistry 307, 249-264.
- [13] Wang, H., Xiao, Y., Fu, L., Zhao, H., Zhang, Y., Wan, X., Qin, Y., Huang, Y., Gao, H., and Li, X. (2010) High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*, BMC biotechnology 10, 14.
- [14] Sarduy, E. S., Muñoz, A. C., Trejo, S. A., and Planes, M. d. I. A. C. (2012) High-level expression of Falcipain-2 in *Escherichia coli* by codon optimization and auto-induction, Protein expression and purification 83, 59-69.
- [15] Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L., and Burnett, J. P. (1982) Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins, Science 215, 687-689.
- [16] Lee, S. Y. (1996) Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Trends in Biotechnology 14, 431-438.
- [17] Yee, L., and Blanch, H. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, Nature Biotechnology 10, 1550-1556.
- [18] Kramer, W., Elmecker, G., Weik, R., Mattanovich, D., and Bayer, K. (1996) Kinetic Studies for the Optimization of Recombinant Protein Formation, Annals of the New York Academy of Sciences 782, 323-333.
- [19] Alibolandi, M., and Mirzahoseini, H. (2011) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies, Biochemistry research international 2011.
- [20] Leandro, P., Lechner, M. C., de Almeida, I. T., and Konecki, D. (2001) Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system, Molecular genetics and metabolism 73, 173-178.
- [21] Savari, M., Esfahani, S. H. Z., Edalati, M., and Biria, D. (2015) Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method, Protein expression and purification 114, 128-135.
- [22] Sato, S., Ward, C. L., Krouse, M. E., Wine, J. J., and Kopito, R. R. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation, Journal of Biological