مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، بهمن ۱۳۹۳، ۱۰۹۰-۱۰۸۳

بررسی ترکیب محیط کشت پیچیده برای بهبود تولید *ایمونوتوکسین اونتاک* بوسیله سویه اشریشیاکلی نوترکیب

محمد حیدری[۱]، سید مرتضی رباط جزی[۲]، مهدی زین‌الدینی[۳]

دریافت مقاله: ۹۳/۵/۱۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۶/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۹/۲۴ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۳

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر به منظور درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان به روش‌های زیستی روی آوردند که یکی از پر کاربردترین این روش‌ها استفاده از پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. ایمونوتوکسین اونتاک یک داروی ویژه برای درمان سرطان جهت بیماران مبتلا به لوکمیا، لنفوما و ملانوما است. با توجه به رشد چشمگیر سرطان در جامعه امروزی، بومی‌سازی ساخت داروهای نوترکیب امری ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق، بهینه‌سازی ترکیب شیمیایی محیط کشت پیچیده برای بیان ایمونوتوکسین نوترکیب اونتاک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه آزمایشگاهی است. ترکیب محیط کشت، غلظت‌های مختلف IPTG به عنوان القاگر و زمان القاء در بیان ایمونوتوکسین نوترکیب اونتاک بهینه‌سازی شد. غلظت سلول بر اساس روش کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و میزان بیان پروتئین توسط روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: محیط کشت پیچیده اصلاح شده حاوی: glucose: 6g/l، K_2HPO_4: 12.5g/l، KH_2PO_4: 2.3g/l، Yeast extract:20g/l، Tryptone: 10g/l به عنوان محیط کشت بهینه تعیین گردید. بهترین زمان القاء توسط IPTG با غلظت 0.1mM، در کدورت نوری OD_{600nm}=۳ تعیین شد. بیشترین مقدار تولید بیومس و بیان پروتئین هدف در محیط کشت بهینه‌سازی شده به میزان OD_{600nm}=۵/۵ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: استفاده از منبع کربن گلوکز در ترکیب محیط کشت پیچیده نسبت به محیط کشت LB بیان بهتری می‌دهد. همچنین، مقدار بیومس تولید شده نسبت به محیط کشت LB، ۳/۵ برابر افزایش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اونتاک، محیط کشت پیچیده، بهینه‌سازی

۱- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه مهندسی بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فن آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
تلفن: ۲۲۹۷۴۶۰۶-۰۲۱، دورنگار: ۲۲۹۷۴۶۰۴-۰۲۱، ایمیل: s_m_robatjazi@mut.ac.ir
۳- استادیار گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فن آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

مقدمه

سرطان به عنوان یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر افراد در دنیا و ایران شناخته شده و هرسال بر آمار مبتلایان به آن افزوده می‌شود. درمان‌های رایج نه تنها کافی نیستند بلکه خود مسبب عوارض جانبی زیادی می‌باشند [۱]. زیست فناوری، با استفاده از روش‌های DNA نوترکیب، نقش مهمی‌در تولید داروها و واکسن‌ها ایفا کرده است. محصولات نوترکیب که با دستکاری‌های ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف همراه است، موجب تحول عظیمی در فرآورده‌های دارویی شده است، به طوری که امروزه شاهد مصرف فرآورده‌های نوترکیب دارویی با وزن مولکولی بالا به جای مولکول‌های شیمیایی کوچک هستیم. امروزه از روش‌های پروتئین درمانی برای درمان سرطان استفاده زیادی می‌شود. در حال حاضر محققین با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک نوعی از داروهای هوشمند پروتئینی با نام ایمونوتوکسین را طراحی کرده‌اند که با هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی از آسیب به بافت‌های سالم بدن تا حد زیادی جلوگیری می‌کند [۲]. ایمونوتوکسین یک ماده زیستی و دارای دو بخش کاملاً مجزا است که توسط رابط‌های مشخص و به صورت کووالان به یکدیگر متصل هستند: یک بخش ایمنی که نقش تشخیصی و اتصال ایمونوتوکسین به گیرنده‌های خاص را برعهده دارد و یک بخش توکسینی یا سمی که نقش سیتوتوکسیک را ایفا می‌کند. بر این اساس توکسین مربوطه هدفمند شده و بواسطه بخش ایمنی طیف مشخص از سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهد و سبب مرگ سلولی می‌شود [۳]. ایمونوتوکسین اونتاک شامل توالی اسید آمینه قطعه A,B (Met1-Thr387)-His از توکسین دیفتری که با توالی اینترلوکین ۲ انسانی (Ala1-Thr133) همراه شده که دارای ۵۲۱ اسید آمینه، و وزن مولکولی ۵۸ کیلودالتون می‌باشد به همین خاطر به نام DAB389-IL2 نیز نامیده می‌شود [۴-۵]. DAB389-IL2 در ۵ فوریه ۱۹۹۹ پس از آزمایشات بالینی متعدد موفق به دریافت تأییدیه FDA برای کاربردهای بالینی شد [۳]، هدف اصلی این دارو بیماری Cutaneous T cell lymphoma (CTCL) بود اما به کارگیری این ایمونوتوکسین در آزمایشات بالینی در بیماری‌هایی از قبیل Psoriasis, Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), non-Hodgkin lymphoma (NHL) و چندین بیماری دیگر خصوصاً بیماری‌های خودایمنی مؤثر واقع شد [۶-۸].

CTCL سرطان لنفوسیت‌های T است که یک نوع سلول سفید خون می‌باشد عمدتاً پوست را تحت تأثیر قرار می‌دهد به این معنی که سلول‌های T بدخیم در بدن شروع به مهاجرت به سمت پوست می‌کنند. اما در بیماران با بیماری پیشرفته می‌تواند خون، غدد لنفاوی و ارگان‌های حیاتی را هم درگیر کند [۹].

اگر چه امروزه ارگانیسم‌ها و سامانه‌های بیانی بسیار متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، باکتری اشریشیاکلی اولین میزبانی بود که برای تولید داروی نوترکیب مورد استفاده قرارگرفت و به نظر می‌آید پیشرفت‌های قابل توجهی با استفاده از آن، در این حوزه از فناوری زیستی صورت گیرد. رشد سریع و سرعت بالای تولید پروتئین و دانش زیادی که در مورد فیزیولوژی اشریشیاکلی وجود دارد، به همراه ابزار کارآمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم‌های بیانی مبدل ساخته است [۱۰]. برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی، نیاز به استفاده از یک محیط کشت غنی از مواد مغذی می‌باشد. محیط کشت مایع LB محیط کشت مناسب برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری

اشریشیاکلی است. این محیط منبع کربن اختصاصی ندارد و رشد باکتری را تا تراکم‌های سلوی بالاتر از OD_{600nm}=۲-۴ را تأمین نمی‌کند. پس برای این که تراکم سلولی بالاتر رود و در کنار آن بیان پروتئین افزایش یابد نیاز است که تغییراتی در ترکیب محیط کشت انجام شود. در این پژوهش ترکیب و غلظت محیط کشت، مقدار غلظت القاگر، زمان القاء نسبت به محیط کشت LB برای افزایش بازدهی تولید (بیومس) و بیان ایمونوتوکسین اونتاک در سویه نوترکیب اشریشیاکلی که در مطالعات قبلی طراحی شده بود، در یک محیط کشت پیچیده اصلاح شده بهینه‌سازی شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق آزمایشگاهی از سویه نوترکیب BL21(DE3) حاوی پلاسمید PET-IDZ (طراحی و تهیه شده در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر) استفاده گردید.

از محیط کشت LB (حاوی پپتون ۱۰ g/l، عصاره مخمر ۵g/l و کلرید سدیم ۵ g/l) برای تهیه بانک سلولی و تهیه مایه تلقیح استفاده شد. اگرچه تاکنون هیچ گزارشی در مورد بیان پروتئین اونتاک در محیط کشت پیچیده ارائه نشده است، با این وجود مطالعات قبلی نشان می‌دهد مواد مناسب مورد استفاده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دیگر عبارتند از: منبع کربن (گلوکز، گلیسرول، ساکارز، لاکتوز)، تریپتون، عصاره مخمر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدرژن فسفات [۱۲-۱۱].

باکتری اشریشیاکلی در دامنه وسیعی از شرایط محیطی همچون دمای ۲۵-۴۰°c، pH ۶/۵-۸/۵، دور همزن rpm ۱۵۰-۲۵۰ قادر به رشد می‌باشد. با توجه به تحقیقات قبلی، باکتری در شرایط دمای ۳۷C°، pH=۷ دور همزن ۲۵۰rpm تکثیر گردید [۱۳-۱۲]. محیط کشت در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. به محیط کشت استریل متناسب با وکتور مورد استفاده، معمولا آنتی‌بیوتیکی افزوده می‌شود تا امکان انتخاب پذیری سلول‌های حاوی پلاسمید را فراهم نماید. در این تحقیق از آمپی‌سیلین به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد [۱۳]. میزان رشد سلول‌ها از طریق جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به منظور جداسازی سلول‌ها، میکروتیوپ‌های پرشده (۱ml) حاوی سلول اشریشیاکلی با دور همزن ۱۲۰۰۰ rpm، زمان ۵ دقیقه و دمای ۴ C° سانتریفیوژ شد. همه آزمایشات انجام شده در ارلن ml ۲۵۰، با نسبت ۲/۵ به ۱ (۱۰۰ ml محیط کشت) انجام گردید.

برای بهینه‌سازی بیان ایمونوتوکسین نوترکیب اونتاک در کشت فلاسک چندین پارامتر مورد مطالعه قرار گرفت. این پارامترها شامل محیط کشت‌هایی با مکمل‌های کربنی متفاوت (گلوکز، ساکارز، لاکتوز، گلیسرول)، مقدار غلظت القاگر (ایزو پروپیل تیوگالاکتوزید یا IPTG)، زمان القاء و غلظت‌های مختلف مکمل کربنی (۹،۶،۳ g/l) مورد استفاده قرار گرفت. تأثیر تمام پارامترها در بیان ایمونوتوکسین اونتاک هم به صورت مجزا و هم در ارتباط با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت ترکیبات دیگر محیط کشت، طبق گزارشات قبلی ثابت در نظر گرفته شد [۱۲]، که عبارتند از:

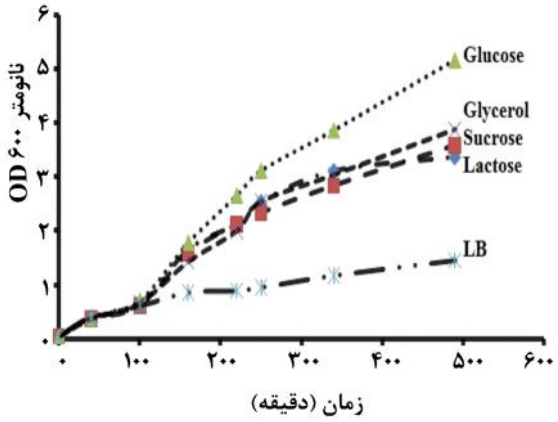
yeast ،KH_2PO_4:2.3gr/l ،K_2HPO_4:12/5 gr/l extract:20gr/l، tryptone:10gr/l. همچنین غلظت‌های متفاوت IPTG (0.1,0.5,1mM) برای بیان پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت [۱۲].

بعد از اتمام زمان القاء و جمع‌آوری سلول‌ها، به هرکدام از میکروتیوپ‌ها ۳۵ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد و به

کمک ورتکس به خوبی، هم زده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش(دمای ۱۰۰C°) حرارت داده شد تا سلول‌ها لیز شوند. جهت انجام الکتروفورز، از سیستم الکتروفورز (شرکت BIORAD نام کشور سازنده) استفاده شد. سپس نمونه‌ها در چاهک‌های ژل اکریل آمید - بیس اکریل آمید ۱۲/۵٪ ریخته شدند و ولتاژ ۱۰۰ در دستگاه الکتروفورز انتخاب گردید. سپس ژل‌ها با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شده و باندهای پروتئینی مشاهده و بررسی شدند [۱۴].

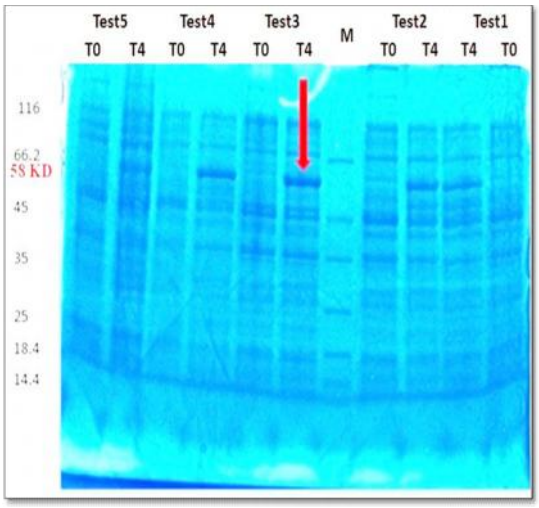
نتایج

منابع کربنی متفاوتی نسبت به محیط کشت LB مورد بررسی قرارگرفت (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار رشد باکتری در محیط کشت پیچیده با منابع کربنی متفاوت

نتایج نشان داد اضافه کردن منبع کربنی گلوکز به ترکیب محیط کشت پیچیده باعث بیان بهتر محصول نسبت به منابع کربنی دیگر می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲- بیان ایمونوتوکسین اونتاک در محیط کشت پیچیده با منابع کربنی متفاوت

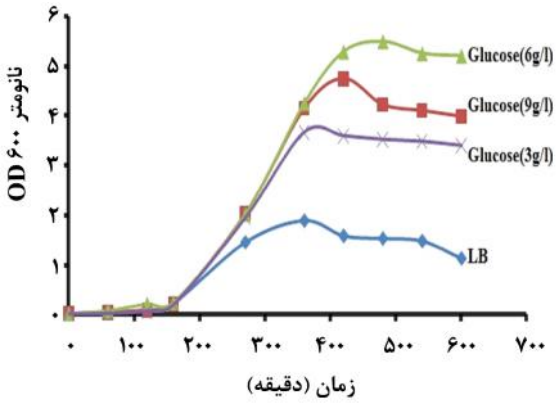
بر روی ژل SDS-PAGE. T0: زمان قبل از القاء، T4: زمان ۴ ساعت بعد از القاء

Test1: ساکارز، Test2: لاکتوز، Test3: گلوکز، Test4: گلیسرول، Test5: LB



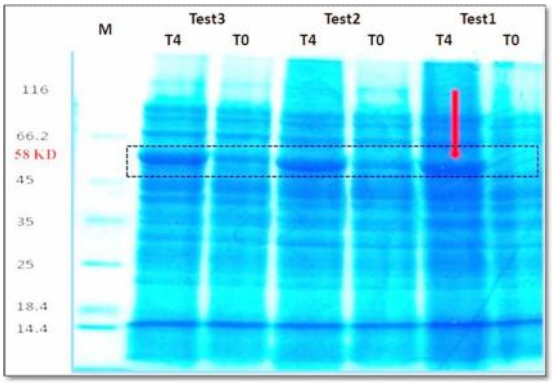
شکل ۳- نمودار ستونی مربوط به مقدار سلول تولید شده در محیط کشت پیچیده با منابع کربنی

شکل ۴ نمودار رشد باکتری را در محیط کشت‌های متفاوت در کشت فلاسک نشان می‌دهد. بیشترین مقدار رشد سلول مربوط به محیط کشت حاوی گلوکز با غلظت ۶ g/l می‌باشد.



شکل ۴- نمودار رشد باکتری در محیط کشت های پیچیده

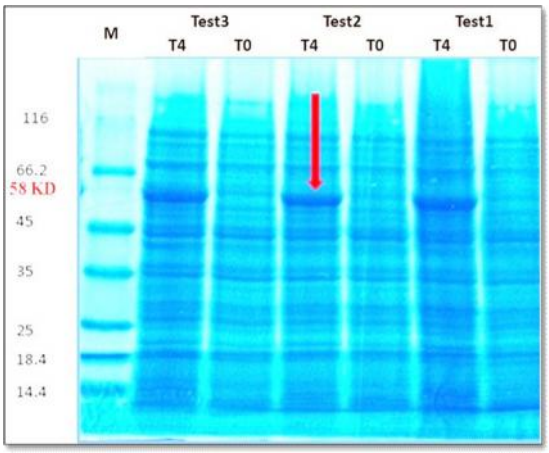
نتایج تأثیر غلظت القاء گر IPTG بر بیان ایمونوتوکسین در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند غلظت‌های زیاد IPTG، تأثیری در روند بیان پروتئین ندارد، همچنین، به علت هزینه بالای پودر IPTG، می‌توان از غلظت پایین IPTG 0.1mM برای بیان این پروتئین استفاده نمود.



شکل ۵- تأثیر غلظت IPTG در بیان ایمونوتوکسین اونتاک بر روی ژل SDS-PAGE، T0: زمان قبل از القاء، T4: زمان ۴ ساعت بعد از القاء

(IPTG=0.1mM :Test1)، (IPTG=0.5Mm :Test2)، (IPTG=1mM :Test3)

شکل ۶ تأثیر غلظت بیومس در میزان بیان پروتئین در زمان القاء را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار تولید بیومس در زمان القاء با OD_{600nm}=۳ تعیین گردید. در یک محیط کشت یکسان، زمانی که مقدار جذب نوری به عدد ۳ می‌رسد، بیان بهتری نسبت به جذب نوری‌های دیگر مشاهده شد.



شکل ۶- تأثیر غلظت بیومس در زمان القاء در بیان ایمونوتوکسین اونتاک بر روی ژل SDS-PAGE، T0: زمان قبل از القاء، T4: زمان ۴ ساعت بعد از القاء

(Test1: OD_{600nm}=1.5)، (Test2: OD_{600nm}=3.0)، (Test3: OD_{600nm}=3.5)

بحث

در این پژوهش نوع محیط کشت به عنوان یکی از عوامل مهم به منظور فراهم کردن محیط مناسب برای رشد بهینه باکتری و همچنین، تولید بیشتر پروتئین هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق چهار نوع محیط کشت با منبع کربنی متفاوت استفاده شد. در پژوهشی که توسط Collins و همکارانش انجام شده است، مشخص گردید که یکی از عوامل مؤثر در تولید پروتئین silk-elastin-like نوترکیب محیط کشت می‌باشد. با آزمایشاتی که انجام دادند محیط کشت کمپلکس غنی از عصاره مخمر، بافر و منبع کربنی (گلیسرول) به عنوان محیط کشت بهینه برای بیان پروتئین SELPs انتخاب کردند [۱۲]. همچنین B.A Fong و همکارش با بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت توانستند بهترین محیط کشت برای بیان پروتئین Elastin-like polypeptides (ELPs) را انتخاب نمایند [۱۵]. در پژوهش دیگری که A. M Velez و همکارانش برای تولید penicillin G در سویه نوترکیب اشریشیاکلی انجام دادند با تغییرات محیط

کشت و شرایط آن به مقدار قابل توجهی بازدهی محصول را افزایش دادند [۱۶].

در این پژوهش انواع محیط کشت با غلظت‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. انتخاب محیط کشت حاوی گلوکز با غلظت ۶g/l به منظور افزایش توده سلولی و تولید زیاد پروتئین نوترکیب صورت گرفت. نتایج نشان داد نوع محیط کشت مؤثرترین عامل است و محیط کشت پیچیده همراه با گلوکز ۶g/l به دلیل افزایش زیاد توده سلولی و در نتیجه تولید زیاد پروتئین محصول، مناسب‌ترین محیط کشت شناخته شد. مقدار القاگر از جمله عوامل مهمی است که بر روی میزان بیان پروتئین نوترکیب اثر می‌گذارد. زمان القاء نیز از عوامل مهم در بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب می‌باشند چرا که بازدهی تولید پروتئین نوترکیب به نقطه‌ای از تابع رشد که القاء صورت می‌گیرد وابستگی زیادی دارد [۱۸-۱۷]. بررسی منحنی رشد بدون القاء و همراه با القای سویه نوترکیب تهیه شده نشان داد بهترین زمان القاء در این سویه نوترکیب ابتدای فاز لگاریتمی و در OD_{600nm}=۳ است.

نتایج آزمایش‌ها و بهینه‌سازی lecina و همکارانش در شرایط تولید نشان داد مقدار IPTG تأثیر زیادی بر بازدهی تولید پروتئین نوترکیب ندارد و غلظت زیاد آن باعث سمیت در محیط کشت می‌شود که نهایتاً منجر به محدود شدن زمان رشد سلول می‌شود [۱۹]. نتایجی که در این پژوهش گرفته شد نیز مشخص کننده مطالعات انجام شده بود. بنابراین به دلیل قیمت بالای IPTG و همچنین، اثر سمی آن در تولید پروتئین دارویی مقدار کمتر (0.1Mm) IPTG برای بیان ایمونوتوکسین اونتاک پیشنهاد و انتخاب شد.

نتیجه‌گیری

پس از بهینه‌سازی شرایط بررسی شده در محیط کشت پیجیده، منبع کربن: گلوکز با غلظت: 6g/l، KH_2PO_4:2.3g/l، K_2HPO_4:12.5g/l، Yeast extract:20g/l، Tryptone:10g/l. غلظتIPTG:0.1mM، زمان القاء در جذب نوری OD_{600nm}=۳ به دست آمد. استفاده از محیط کشت پیچیده حاوی گلوکز نسبت به محیط کشت LB و منابع کربنی گزارش شده دیگر، بیان بالاتری می‌دهد. همچنین، غلظت بیومس تولیدی در حدود ۱۱/۸g/l درمحیط کشت پیچیده اصلاح شده تعیین گردید که نسبت به محیط کشت LB به مقدار ۳/۵ برابر افزایش نشان می‌دهد، که می‌تواند از لحاظ اقتصادی قابل توجه باشد.

References

[1] Mahdiyeh N, Momeni Sh. Comprehensive Review of Genetics. 2 rd ed. Tehran: Farda Publication. 2011. [Farsi].

[2] Wang R, Gan C, Gao W, He W, Wang X, Peng Y, et al. A novel recombinant immunotoxin with the smallest ribosome-inactivating protein Luffin P1: T-cell cytotoxicity and prolongation of allograft survival. *J Cellular Molecular Med* 2010; 14: 578-586.

[3] Zeinoddini M. Immunotoxin: The characterization and its application in protein therapy.1st. Tehran: Malek Ashtar University of Technology Press. 2011; pp: 1-65. [Farsi].

[4] Liger D, YanderSpek JC, Gaillard C, Cansier C, Murphy JR, Leboulch P, et al. Characterization and receptor specific toxicity of two diphtheria toxin-related interleukin-3 fusion proteins DAB389-mIL-3 and DAB389-(Gly4Ser)2-mIL-3. FEBS Letters. 1997; 406: 157-61.

[5] Saleh MN, LeMaistre CF, Kuzel TM, Foss F, Platanias LC, Schwartz G, et al. Antitumor activity of DAB389IL-2 fusion toxin in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 63-73.

[6] Foss FM. DAB389IL-2 (Denileukin Diftitox, ONTAK): A New Fusion Protein Technology. *Clin Lymphoma* 2000; 1: 27-31.

[7] Frankel AE, Fleming DR, Hall PD, Powell BL, Black JH, Leftwich C, et al. A Phase II Study of DT Fusion Protein Denileukin Diftitox in Patients with Fludarabine-refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3555-61.

[8] Foss FM, Bacha P, Osann KE, Demierre MF, Bell T, Kuzel T. Biological Correlates of Acute Hypersensitivity Events with DAB389IL-2 (Denileukin Diftitox, ONTAK®) in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Decreased Frequency and Severity with Steroid Premedication. *Clin Lymphoma* 2001; 1: 298-302.

[9] Schwartz R, lambert WA.Cutaneous T-cell Lymphoma (CTCL). http://emedicine. Medscape.com/article/ 2139720, overview.2013.

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

[11] Varedi Koolaee S M, Shojaosadati S A , Babaeipour V,Ghaemi N. Physiological and Morphological Changes of Recombinant E. coli During Over-Expression of Human Interferon-g in HCDC. Iranian Journal of Biotechnology. 2006; 4: 230-238.

[12] Collins T, Azevedo-Silva J, Costa A, Branca F, Machado R and Casal M. Batch production of a silk-elastin-like protein in E. coli BL21 (DE3): key parameters for optimization. Microbial Cell Factories. 2013; 1: 12-21.

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

[14] Zeinoddini M .Theoretical and practical guide to protein analysis methods. 1st.Tehran: Malek Ashtar University of Technology Press, 2011; 1-30. [Farsi].

[15] Fong B A, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density E. coli fermentation. Microbe Cell Fact. 2010; 77: 9-19.

[16] Velez AM, da Silva AJ, Luperni Horta AC, Sargo CR, Campani G, Gonçalves Silva G, et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in rE. Coli fed-batch cultivations. BMC Biotechnology. 2014; 21: 6-14.

[17] Muntari B, Amid A, Mel M, Jami M S, Salleh H M. Recombinant bromelain production in Escherichia coli: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. AMB Express. 2012; 15: 2-12.

[18] Kelley KD, Olive LQ, Hadziselimovic A, Sanders C R. Look and see if it is time to induce protein expression in Escherichia coli cultures. Biochemistry. 2010; 49: 5405-7.

[19] Lecina M, Sarro E, Casablancas A, Godia F, Cairo J. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of Escherichia coli M15 under glucose limiting conditions. *Biochemical Engineering Journal* 2013; 70: 78-83.

Investigation of the Complex Culture Medium Composition for Improved Production of *ONTAK Immunotoxin* by Recombinant Escherichia Coli

M. Heydari[1], S.M. Robatjazi[2], M. Zeinoddini[3]

Received: 02/08/2014 Sent for Revision: 21/09/2014 Received Revised Manuscript: 15/12/2014 Accepted: 24/12/2014

Background and Objective: In recent years, the biological methods have been considered as a most promising candidate for the cancer treatment. One of the most applicable methods is recombinant proteins. ONTAK immunotoxin is a special drug for cancer therapy of leukemia, lymphoma and melanoma. With respect to the dramatic growth of cancer in today's society, production of recombinant protein drugs seems to be necessary. In this research, optimization of complex culture medium for the expression of ONTAK recombinant has been studied.

Materials and Methods: In this experimental study, various concentrations of IPTG (Isopropyl Thiogalactopyranoside) were used as an inductor and the medium components and induction time optimized for expression of ONTAK immunotoxin. The cell concentration was measured by optical density at 600 nm and the protein expression levels were analyzed by SDS-PAGE gel.

Results: The modified complex culture medium containing: glucose 6 g/l; K_2HPO_4 12.5 g/l; KH_2PO_4 2.3 g/l; Yeast Extract 20 g/l; Tryptone 10 g/l; were determined as optimal medium. OD_{600nm}=3.0 was determined as the best time for induction by IPTG at a concentration of 0.1mM. The maximum amount of the expression of the target protein was determined at OD_{600nm}=5.5.

Conclusion: The adding of additive carbon source (glucose) to the complex medium was caused a better ONTAK immunotoxin expression as compared with the amount of expression observed in LB medium. The amount of produced biomass on the optimized medium increased over 3.5 times in comparison to LB medium.

Key words: ONTAK, Complex culture medium, Optimization

Funding: This research was funded by Malek Ashtar University of Technology.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Malek Ashtar University of Technology.

How to cite this article: Heydari M, Robatjazi SM, Zeinoddini M. Investigation of the Complex Culture Medium composition for Improved Production of *ONTAK Immunotoxin* by Recombinant Escherichia Coli. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 13(11): 1083-90. [Farsi]

1 - MSc of Chemical Engineering-Biotechnology, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Biochemical Engineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

(Corresponding Author) Tel: (021) 22974606, Fax: (021) 22974604, E-mail: s_m_robatjazi@mut.ac.ir

3 -Assistant Prof., Dept. of Genetic Engineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran