

بیان پروتئین نو ترکیب EIT در شرایط شبیه سازی بی وزنی



مریم صلواتی فرا^۱، شیدا کاشان پور^۲ و علی هاتف سلمانیان^{۳*}

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

^۲ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

^۳ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۶

چکیده

باکتری بیماری‌زای *E. coli* O157:H7 قادر به ایجاد طیف وسیعی از عوارض همانند اسهال خونی و سندرم اورمی همولیتیک می‌باشد. به دلیل مشکلات موجود در درمان آنتی بیوتیکی، به نظر می‌رسد ایمن سازی، مناسب‌ترین روش مبارزه با این باکتری باشد. پروتئین‌های اینتیمین (EspA و Tir, Intimin)، سه پروتئین اصلی در اتصال باکتری مذکور به اپیتلیال سطحی دستگاه گوارش می‌باشند. از طریق ممانعت از اتصال پروتئین‌های مذکور در مراحل ابتدایی حمله باکتری، کلونیزاسیون محدود شده و بیماری مهار خواهد شد. محققان با انتخاب بخش‌های مؤثر پروتئین‌های مذکور و تولید یک پروتئین نو ترکیب کایمر با اتصال آن-ها به یکدیگر، ایمونوزن مناسب و کارآمدی جهت پیشگیری از بروز این بیماری ارائه نموده‌اند. از این رو دستیابی به مقادیر بالای پروتئین نو ترکیب در کنار حفظ کیفیت و کارایی آن، بسیار مهم می‌باشد. با توجه به افزایش کمی و کیفی برخی پروتئین‌های نو ترکیب در شرایط حذف نیروی جاذبه، در مطالعه پیش رو بیان پروتئین نو ترکیب EIT در شرایط شبیه سازی بی وزنی یا میکروگروایتی (ریز گرانش) بر روی دستگاه کلینواستت مورد بررسی قرار گرفت. پس از بهینه سازی شرایط بیان و تأیید پروتئین نو ترکیب با روش‌های ایمنولوژیک، در شرایط ریز گرانش بیان آن القاء گردید و پس از تخلیص پروتئین توسط ستون کروماتوگرافی، مقدار آن با روش‌های استاندارد مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها حاکی از آن بودند که علی‌رغم کاهش میزان بیان در شرایط ریز گرانش که احتمالاً به دلیل عدم هوادهی مناسب محیط کشت بوده است، هم‌چنان پروتئین نو ترکیب با کیفیتی مناسب در شرایط ریز گرانش تولید گردید.

واژه‌های کلیدی: باکتری *E. coli* O157:H7، سندرم اورمی همولیتیک، پروتئین نو ترکیب EIT، شبیه سازی بی وزنی، کلینواستت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۳۶، پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

۵-۱۰ درصد از افراد آلوده، به سندرم اورمی همولیتیک (hemolytic uremic syndrome: HUS) نیز مبتلا می‌شوند که عارضه ای تهدید کننده برای کلیه‌های بیمار است. علاوه بر این در مراحل پیشرفته بیماری، پاسخ‌های التهابی در روده بزرگ بیماران مبتلا بروز نموده و حتی ممکن است به مرگ افراد به ویژه کودکان منجر گردد. درمان‌های آنتی بیوتیکی باعث تشدید HUS شده و از این رو منع مصرف دارند (۱۸ و ۳۷). از این رو واکسیناسیون یکی از روش‌های

سویه O157:H7 باکتری اشریشیاکلاهی انتروهموراژیک (Enterohemorrhagic Escherichia coli: EHEC) یک پاتوژن مهم غذایی می‌باشد که سالانه منجر به بروز دو میلیون مورد بیماری حاد گوارشی در انسان می‌گردد. باکتری EHEC بین انسان و دام مشترک بوده و از طریق آب و غذای آلوده به مدفوع دام، به انسان انتقال پیدا می‌کند. این باکتری در روده کلونیزه شده و معمولاً منجر به کوئلیت هموراژیک خود محدود شونده می‌گردد. با این وجود،

اندک و تلاطم ناچیز محیط می‌باشد بر ویژگی‌های جاندار اثرات قابل توجهی دارد (۲۲). میکروب‌ها نیز از این قاعده مستثنی نبوده و حذف یا کاهش جاذبه (ریز گرانش) منجر به مجموعه‌ای از تغییرات در فیزیولوژی نظیر سرعت رشد، تغییر نحوه مصرف سوبستراها، مقاومت به انواع تنش‌ها مانند آنتی بیوتیک‌ها و به علاوه تغییر در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه می‌شود (۱۳). بررسی تغییرات رخ داده در شرایط بی وزنی واقعی در پروازهای فضایی، به دلیل محدودیت تکرار پذیری و هزینه‌های بالا، محدود بوده و اکثر آزمایشات در شرایط شبیه سازی شده بر روی زمین انجام می‌گردند (۹). نظر به اینکه برخی پروتئین‌های نوترکیب در شرایط واقعی فضا (۱۲) و دستگاه‌های شبیه ساز بی وزنی (Simulated microgravity: SMG) (۱۲، ۱۴، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۸) افزایش بیان داشته‌اند، نتیجه گیری شده است که در شرایط ریز گرانش، انرژی که سلول قبلاً برای فائق آمدن بر نیروی جاذبه به کار می‌برده است را در مسیرهایی مانند بیوستتر دیواره جهت فعال سازی مسیر حفظ تمامیت خود، تغییر بیان ژن‌های پاسخ‌گو به تنش و ساخت ترکیباتی که باعث افزایش تحمل تغییرات فشار اسمزی می‌شوند مانند ترهالوز و گلیسرول معطوف می‌نماید (۷ و ۳۴). باتوجه به افزایش کمی و کیفی برخی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در شرایط ریز گرانش و همچنین قدرت پروتئین نوترکیب EIT در ایمنی زایی علیه عفونت‌های چندگانه حاصل از *E. coli*: O157:H7، در این پژوهش به منظور بهینه سازی تولید این کایمر پروتئینی نسبتاً بزرگ به عنوان کاندید واکسن، بیان آن در شرایط ریز گرانش با دستگاه کلینواستت مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روشها

پلاسمید بیانی pET28a حاوی قطعه ژن *eit* نوترکیب (۱۶۸۰ جفت باز) از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری دریافت گردید و با پرایمرهای عمومی T7 با استفاده از روش PCR، حضور ژن مذکور تأیید شد. توالی

امیدبخش برای مبارزه با این بیماری می‌باشد و مطالعات گسترده‌ای در این خصوص در حال انجام می‌باشد (۲۹). ایجاد عفونت‌های روده‌ای توسط این عامل بیماری‌زا، طی دو مرحله انجام می‌پذیرد. ابتدا باکتری توسط اجزای سلولی مانند فیمریا و پروتئین‌های اتصالی خود به سلول هدف متصل شده و متعاقب آن بافت هدف تخریب می‌گردد. سپس با انتقال ترکیبات سمی تولید شده توسط باکتری به درون بافت، تخریب گسترده‌تر می‌شود (۲۴). براین اساس، کلونیزه شدن پیش نیاز اصلی شروع بیماری بوده و پروتئین‌های کلیدی در این مرحله، کاندیدهای مهمی جهت مطالعات واکسن علیه باکتری EHEC می‌باشند. اینتیمین (Intimin)، Tir و EspA سه پروتئین اصلی در اتصال باکتری مذکور به اپیتلیال سطحی دستگاه گوارش بوده و تحقیقات نشان داده‌اند که از طریق ممانعت از اتصال آن‌ها در مراحل ابتدائی حمله باکتری، کلونیزاسیون محدود خواهد شد و بیماری مهار می‌گردد (۳۱). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پروتئین‌های مذکور کاندیدهای مناسبی برای اهداف پیشگیرانه از بروز این بیماری بوده و توانسته‌اند ایمنی مناسبی را علیه بیماری ایجاد نمایند (۲۷ و ۳۵). از این رو محققان با انتخاب بخش‌های مؤثر پروتئین‌های مذکور و تولید یک پروتئین نوترکیب کایمر با اتصال آن‌ها به یکدیگر، ایمونوژن مناسب و کارآمدی جهت پیشگیری از بروز این بیماری ارائه نموده‌اند (۱۵، ۲۶ و ۳۲). موجودات زنده، سلول‌ها و مولکول‌های آن‌ها تحت تأثیر نیروهای وارده از محیط زیست خود قرار داشته و این نیروها بر فعالیت‌های زیستی اثر گذار است. جاذبه، نیرویی است که به صورت مداوم به موجودات زنده ساکن بر روی کره زمین اعمال می‌شود و همه جانداران تحت تأثیر این نیرو، تشکیل، رشد و تکامل یافته‌اند (۲۸). در شرایط حذف این نیرو (بی وزنی) مانند آن چه برای فضانوردان اتفاق می‌افتد تحولاتی در سلول‌ها و مولکول‌های موجودات رخ می‌دهد. در حقیقت ویژگی‌های شرایط فقدان جاذبه که شامل تنش برشی کم، رسوب گذاری

جمع آوری رسوب سلولی (۵ دقیقه / ۵۰۰۰ RPM) توسط سانتریفیوژ انجام گردید و سپس با روش الکتروفورز روی ژل آکریل امید ۱۲ درصد (SDS-PAGE)، بیان پروتئین بررسی شد. به منظور مقایسه

میزان بیان پروتئین نوترکیب در شرایط ریز گرانش نسبت به جاذبه طبیعی زمین (۱ g)، پس از بهینه سازی زمان بیان، از کشت شبانه به محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین در سه ظرف به صورت زیر تلقیح گردید:

۱- فالکون ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱/۵ حجم محیط LB مایع به همراه ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین و شرایط هوادهی در شیکر با سرعت ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه به عنوان محیط کشت استاندارد.

۲- فالکون ۵۰ میلی لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین فاقد حباب بدون هوادهی در شرایط ریز گرانش بر روی دستگاه کلینواست.

۳- فالکون ۵۰ میلی لیتری پر از محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین فاقد حباب بدون هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی.

دستگاه کلینواستت به کار رفته در این تحقیق جهت شبیه سازی بی وزنی، از نوع یک محوره (دو بعدی) بود که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو (United Nations Office at Vienna, The office for Outer Space Affairs) در اختیار پژوهشگاه هوافضا قرار گرفته بود. کلینواستت در واقع یک شبیه ساز بی وزنی است که دارای صفحه ای می باشد که به آرامی و با سرعتی ثابت حول محور افقی (در جهت یا خلاف جهت عقربه ساعت) می چرخد. به دلیل چرخش حول یک محور منفرد جهت دار ۹۰ درجه نسبت به بردار جاذبه زمین، جهت بردار جاذبه بر روی نمونه قرار گرفته بر روی آن، به صورت ریتیمیک تغییر می کند، و از این رو میانگین بردار جاذبه

پرایمرها به شرح ذیل بودند: T7 promoter: 5'TAATACGACTCACTATAGGG3' و T7 terminator: 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'. پس از تأیید حضور ژن، سویه مستعد BL21(DE3) باکتری *E. coli* تهیه و پلاسمیدهای نوترکیب، براساس روش کوهن و همکارانش به داخل سلول‌ها وارد گردیدند (۴). روند کار به طور خلاصه به این صورت بود که ابتدا میزبان باکتریایی مستعد شده با بافر کلرید کلسیم (۱۰۰ میلی مولار) بر روی یخ به صورت سوسپانسیون درآمد. سپس پلاسمید pET28a حاوی قطعه ژن *eit* نوترکیب، به سوسپانسیون افزوده گشته و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. به منظور ایجاد شوک حرارتی، به مدت ۵ دقیقه به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (۲ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد) منتقل شد و پس از اتمام زمان، به سرعت بر روی یخ قرار گرفت. سپس ۱ میلی لیتر محیط کشت LB فاقد آنتی بیوتیک به محلول افزوده و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در نهایت محلول بر روی پلیت حاوی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. یکی از کلونی‌های رشد نموده، به محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح گردید و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با هوادهی قرار داده شد. در روز بعد ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تلقیح شد (نسبت ۱:۱۰۰) و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با چرخش بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری گردید. پس از رسیدن جذب نوری محیط کشت به حدود ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با استفاده از غلظت یک میلی مولار IPTG (ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاتوزید) بیان پروتئین القاء گردید. جهت بررسی تأثیر فاکتور زمان بر میزان بیان پروتئین، توقف بیان در زمان‌های ۲ ساعت، ۴ ساعت و یک شب پس از القاء انجام شد.

چرخش عقربه ساعت تنظیم گردیده بود شتاب جاذبه g $0/005$ محاسبه گردید (۳۶). شکل ۱ نمونه‌ها بر روی دستگاه کلینواستت را نشان می‌دهد. کلیه آزمون‌ها در شرایط دمایی 37 درجه سانتیگراد، به مدت یک شب و در سه تکرار انجام گردید. در پایان مدت زمان مورد نظر برای بیان پروتئین، باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ (5 دقیقه/ 5000 RPM) جمع آوری گردیده و توسط روش SDS-PAGE بررسی نمونه‌ها انجام شد (۱).



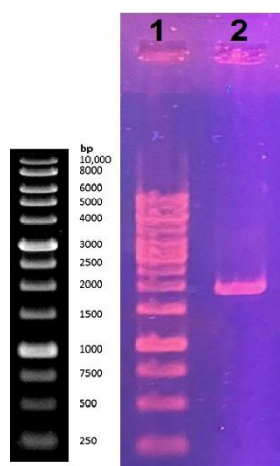
شکل ۱- نحوه قرار گیری نمونه‌ها بر روی دستگاه کلینواستت. A. نحوه قرار گیری نمونه‌ها بر روی صفحه کلینواستت. B. کلینواستت درون انکوباتور.

پروتئین‌های بیانی در *E. coli* به صورت محلول (Soluble) یا نامحلول در فرم اجسام توده ای (Inclusion bodies) قرار می‌گیرند. از این رو جهت بررسی، ابتدا رسوب سلولی حاصل از القاء بیان پروتئین، در بافر لیز کننده (NaH_2PO_4 ، NaCl ، Imidazole) همگن گردید. سپس توسط سونیکاسیون دو بار هر بار به مدت 2 دقیقه و با قدرت خروجی 100 درصد، دیواره‌های سلولی شکسته شده و پس از سانتریفیوژ، رسوب و محلول رویی جدا گردید. محلول رویی حاوی پروتئین‌های محلول (تحت عنوان فاز محلول) و رسوب، حاوی پروتئین به فرم نامحلول به همراه بقایای سلولی می‌باشد. رسوب حاصله را در بافری حاوی اوره (NaH_2PO_4 ، Tris-HCl ، اوره 8 مولار) حل نموده و پس از سونیکاسیون مانند مرحله قبل، به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد با هوادهی قرار داده شد. در انتها، پس از سانتریفیوژ، پروتئین‌های نامحلول در محلول رویی (تحت عنوان فاز نامحلول) قرار گرفته و بقایای سلولی در رسوب باقی ماند. بررسی تمامی نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد (۱). به دلیل قرار گیری نشانه

پروتئین‌های بیانی در *E. coli* به صورت محلول (Soluble) یا نامحلول در فرم اجسام توده ای (Inclusion bodies) قرار می‌گیرند. از این رو جهت بررسی، ابتدا رسوب سلولی حاصل از القاء بیان پروتئین، در بافر لیز کننده (NaH_2PO_4 ، NaCl ، Imidazole) همگن گردید. سپس توسط سونیکاسیون دو بار هر بار به مدت 2 دقیقه و با قدرت خروجی 100 درصد، دیواره‌های سلولی شکسته شده و پس از سانتریفیوژ، رسوب و محلول رویی جدا گردید. محلول رویی حاوی پروتئین‌های محلول (تحت عنوان فاز محلول) و رسوب، حاوی پروتئین به فرم نامحلول به همراه بقایای سلولی می‌باشد. رسوب حاصله را در بافری حاوی اوره (NaH_2PO_4 ، Tris-HCl ، اوره 8 مولار) حل نموده و پس از سونیکاسیون مانند مرحله قبل، به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد با هوادهی قرار داده شد. در انتها، پس از سانتریفیوژ، پروتئین‌های نامحلول در محلول رویی (تحت عنوان فاز نامحلول) قرار گرفته و بقایای سلولی در رسوب باقی ماند. بررسی تمامی نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد (۱). به دلیل قرار گیری نشانه

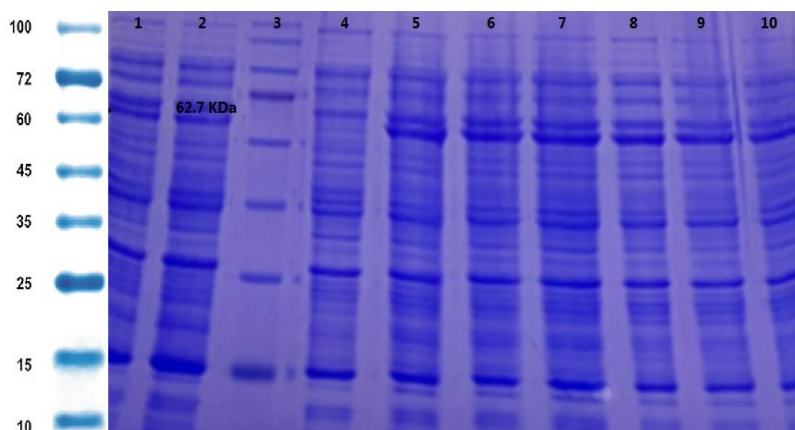
پروتئین نوترکیب، وسترن بلاتینگ انجام شد. در این آزمون از آنتی بادی بر علیه دنباله هیستیدینی (*Anti His tag*) متصل به *Horse HRP* (*Radish Peroxidase*)، به عنوان آنتی بادی جهت ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده گردید. تمامی نمونه‌های مورد آزمایش به اضافه کنترل منفی (محیط کشت حاوی باکتری اما بدون القاء) توسط آزمون SDS-PAGE به طور کامل از یکدیگر تفکیک شده و سپس به غشاء PVDF منتقل گردید. پس از شستشو غشاء و قرار گیری در بافر مسدود کننده

مشاهده باندهای حدود ۲۰۰۰ جفت باز براساس مارکر مولکولی، مؤید تکثیر ژن *eit* بود (شکل ۲).



شکل ۲- تائید حضور سازه ژنی *eit* با روش PCR. ستون ۱: DNA مارکر ۱ کیلو بازی (یکتا تجهیز، ایران)، ستون ۲: محصول تکثیر ژن با پرایمرهای عمومی T7

بیان پروتئین نوترکیب، در ساعات مختلف پس از القاء با IPTG انجام پذیرفت. باتوجه به اینکه وزن مولکولی پروتئین نوترکیب حدود ۶۲/۷ کیلو دالتون می‌باشد، از ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۰ درصد استفاده گردید و مشاهده شد که بالاترین میزان بیان پروتئین نوترکیب EIT، در زمان دو ساعت پس از القاء صورت پذیرفته است (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی و بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب EIT در زمان‌های مختلف بر روی چند کلونی باکتریایی. ستون‌های ۱ و ۲: بیان ۲ ساعت پس از القاء، ستون ۳: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۴: کنترل منفی حاوی ژن بدون القاء با IPTG، ستون‌های ۵-۷: بیان ۴ ساعت پس از القاء، ستون‌های ۸-۱۰: بیان یک شب پس از القاء.

حاوی شیر خشک بدون چربی، Anti His tag جهت ردیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد. جهت آشکار سازی از قرص‌های DAB (Diaminobenzoic acid) به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده گردید (۲). در مرحله بعد، منحنی استاندارد به روش برادفورد جهت تعیین غلظت پروتئین نوترکیب، با استفاده از سرم آلبومین گاوی (سینازن) به عنوان استاندارد، ترسیم شد و سپس غلظت پروتئین تخلیص شده در مقایسه با نمودار ترسیم شده، تعیین گردید (۱).

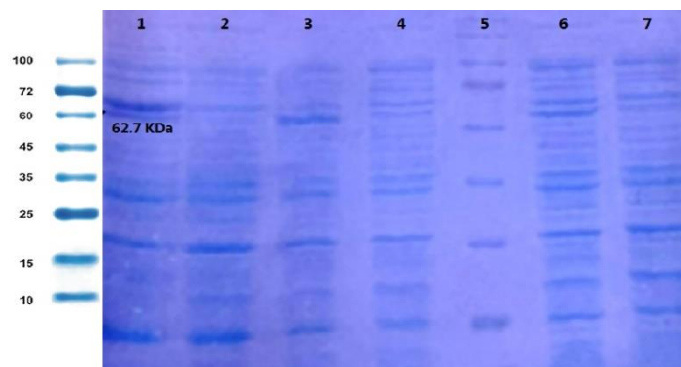
تجزیه و تحلیل آماری نتایج: در انتها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8 نمودارها ترسیم شدند و از نرم افزار آماری SPSS، جهت مقایسه میزان بیان پروتئین‌ها در شرایط مختلف بررسی گردید. مقدار $p\text{-value} \leq 0.05$ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

محصول اختصاصی مربوط به تکثیر ژن *eit* با روش PCR، با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد تائید شد. باتوجه به این که از پرایمرهای عمومی T7 جهت تکثیر ژن *eit* استفاده شده بود به اندازه تقریبی ۱۵۰bp به ابتدای ژن و ۱۵۰bp به انتهای ژن اضافه گردیده است. بنابراین حدود ۳۰۰ جفت باز به قطعه ژنی اضافه شده و

مشاهده گردید (شکل ۴). چنانچه انتظار می‌رفت نتایج نشان‌دهنده میزان بیان بالاتر در فالكون نیمه پر در شرایط جاذبه طبیعی به دلیل هوادهی، نسبت به بقیه حالات بود.

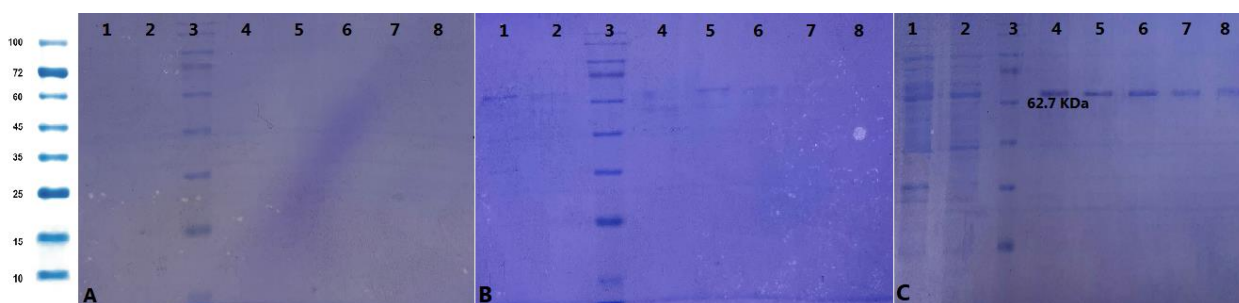
پس از بررسی زمان مناسب جهت بیان، بررسی بیان پروتئین در شرایط ریز گرانش انجام شد اما به دلیل مسائل تکنیکی مربوط به دستگاه کلینواستت، زمان بیان یک شب مقرر گردید و نتایج بر روی ژل SDS-PAGE نسبت



شکل ۴- بیان پروتئین EIT در شرایط مختلف به مدت یک شب. ستون ۱: القاء بیان درون فالكون نیمه پر همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۲: کنترل منفی بیان (بدون القاء با IPTG) درون فالكون نیمه پر همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۳: بیان درون فالكون پر در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۴: کنترل منفی بیان (بدون القاء با IPTG) درون فالكون پر در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۵: مارکر پروتئین، ستون ۶: القاء بیان درون فالكون پر در شرایط ریز گرانش، ستون ۷: کنترل منفی بیان (بدون القاء با IPTG) درون فالكون پر در شرایط ریز گرانش.

از ستون NI-NTA، نمونه‌های خروجی از ستون جمع‌آوری شده و ابتدا بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردیدند (شکل‌های ۵ و ۶).

به منظور دست‌یابی به مقادیر کمی پروتئین نوترکیب بیان شده EIT، در هریک از حالت‌های محلول و یا نامحلول، پس از تخلیص توسط کروماتوگرافی میل‌جذبی با استفاده

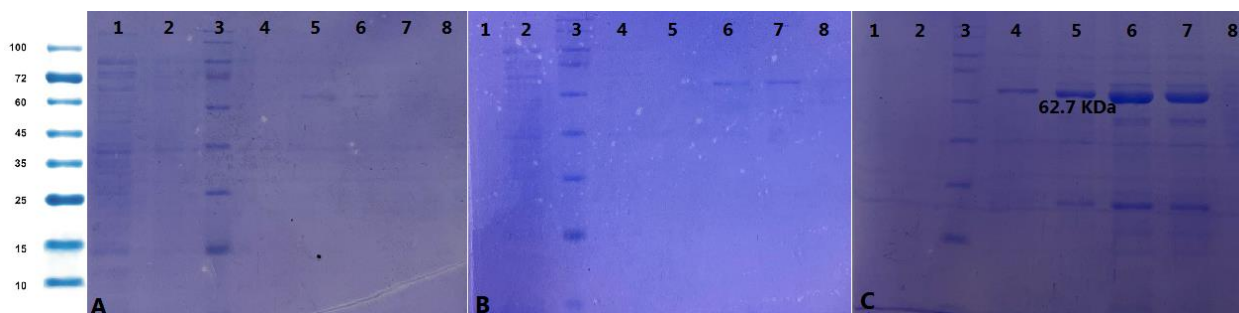


شکل ۵- خالص‌سازی پروتئین نوترکیب در فاز نامحلول. A. فالكون پر فاقد هوادهی در شرایط ریز گرانش. B. فالكون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی و C. فالكون همراه با هوادهی و شرایط جاذبه طبیعی. (ستون‌ها به ترتیب شامل ۱: محلول عبوری از ستون، ۲: شستشو، ۳: مارکر پروتئین، ۴ تا ۸: مراحل خالص‌سازی).

به اینکه اکثراً داده‌ها نرمال نبودند ($P \leq 0.05$) از تست ناپارامتری Mann-Whitney U جهت مقایسه میانگین غلظت پروتئین‌های تولیدی استفاده گردید. نتایج حاکی از اختلاف معنی‌دار میان اکثر گروه‌های تحت آزمایش بود (شکل‌های ۸ و ۹) ($P \leq 0.05$).

سپس جذب نوری نمونه‌ها با روش برادفورد تعیین و غلظت‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد ترسیم شده توسط BSA (شکل ۷)، تعیین گردیدند (جدول ۱).

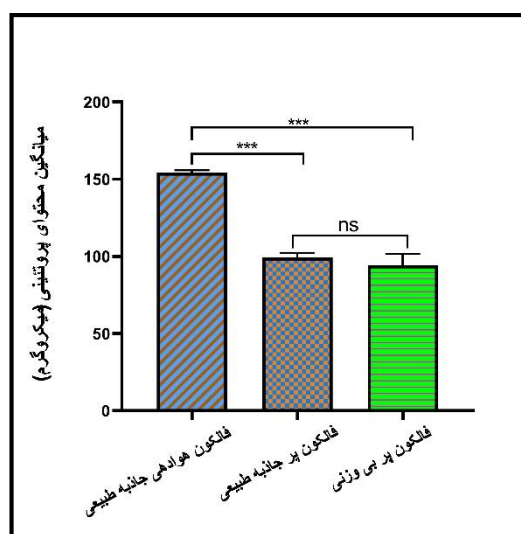
نرمال بودن داده‌های حاصل از میزان بیان پروتئین در شرایط مختلف، در نرم افزار SPSS بررسی گردید و باتوجه



شکل ۶- خالص سازی پروتئین نوترکیب در فاز محلول. A. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط ریز گرانش، B. فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط طبیعی. C. فالکون همراه با هوادهی و شرایط جاذبه طبیعی. (ستون‌ها به ترتیب شامل ۱: محلول عبوری از ستون، ۲: شستشو، ۳: مارکر پروتئین، ۴ تا ۸: مراحل خالص سازی).

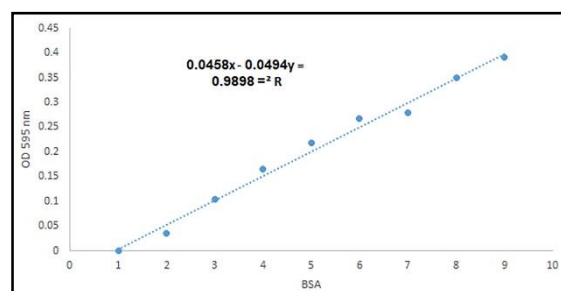
جدول ۱- میانگین محتوای پروتئینی (میکروگرم/میلی لیتر) بیان شده در شرایط مختلف

شرایط نمونه	فاز	میانگین محتوای پروتئین	انحراف معیار
فالکون حاوی محیط کشت همراه با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی	محلول	۱۵۴	۱/۴۶
	نامحلول	۱۲۸	۱/۶۲
فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی	محلول	۹۹	۲/۸۵
	نامحلول	۱۰۴	۲/۶۲
فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط ریز گرانش	محلول	۹۴	۷/۵۰
	نامحلول	۶۴	۱/۰۱



شکل ۸- پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نوترکیب تخلیص شده با روش محلول (Native) در شرایط مختلف، اختلاف معنی دار نشان داد $P \leq 0.05$, Mann-Whitney U (test).

(***): p -value is less than 0.001; Ns: non-significant



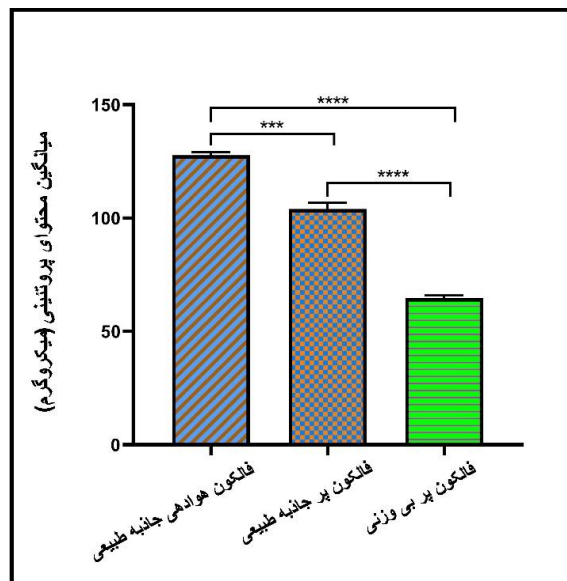
شکل ۷- منحنی استاندارد برادفورد ترسیم شده توسط غلظت‌های مختلف BSA

علاوه بر این، غلظت پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف به صورت محلول و نامحلول نیز با استفاده از مون ناپارامتری T با یکدیگر مقایسه گردید که نتایج آن در شکل ۱۰ ارائه گردیده است ($P \leq 0.05$, Nonparametric T test) (no significant).

بر علیه His-tag و مشاهده باندهای مورد نظر شده بر روی غشاء PVDF، تائید گردید (شکل ۱۱).

بحث

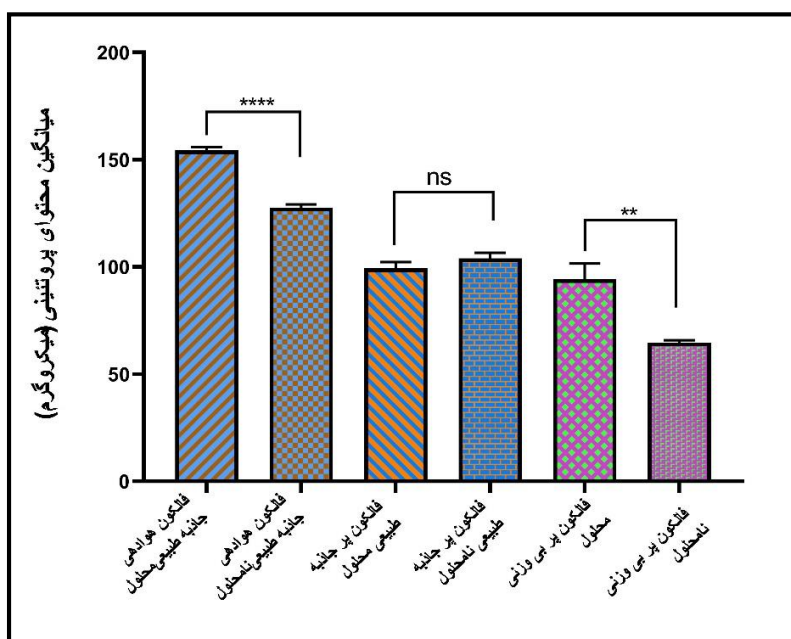
دانش زیست فناوری به سمت دوران جدیدی در حال پیشرفت است که در آن پروتئین‌ها به عنوان دستاوردهایی با اهمیت در نظر گرفته می‌شوند و تحقیق و توسعه روش‌های تولیدی آن‌ها، در دستور کار تحقیقات قرار گرفته است. روش سنتز شیمیایی پروتئین‌ها اگرچه روشی کارآمد برای تولید مولکول‌های کوچک پپتیدی است اما فرایندی پیچیده و هزینه بر بوده و برای تولید پروتئین‌های بزرگ و پیچیده، مناسب نمی‌باشد. از این رو تولید چنین پروتئین‌هایی در مقیاس بالا به طور عمده مستلزم تولید در سیستم‌های زنده است. از سوی دیگر تخلیص پروتئین‌ها از منابع طبیعی فرایندی طولانی، پیچیده و زمان بر بوده و تولید در مقیاس بالا را با مشکل مواجه می‌کند.



شکل ۹- پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف. میزان غلظت پروتئین نو ترکیب تخلیص شده با روش نامحلول (Denature) در شرایط مختلف، اختلاف معنی دار نشان داد $P \leq 0.05$, Mann-Whitney U test).

(**): p -value is less than 0.01; (****): p -value is less than 0.0001

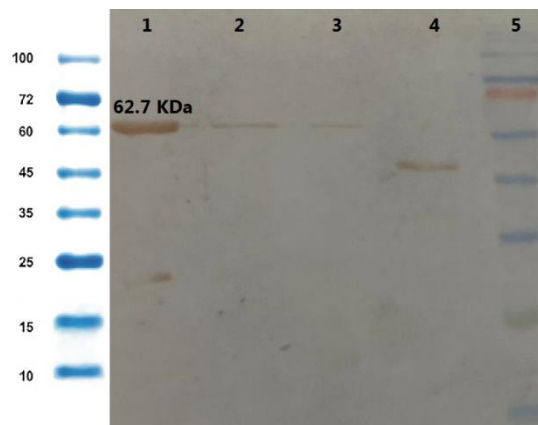
پروتئین نو ترکیب بیان شده با توجه به دنباله هیستیدینی متصل به آن، از طریق روش وسترن بلاتینگ با آنتی بادی



شکل ۱۰- غلظت پروتئین‌های تولیدی در تیمارهای مختلف به صورت محلول و نامحلول اختلاف معنی دار نشان داد $P \leq 0.05$, Nonparametric T (test).

(**): p -value is less than 0.01; (****): p -value is less than 0.0001; Ns: non-significant

تولید این دست پروتئین‌ها پیش روی محققان می‌باشد. با سرعت بخشیدن به اکتشافات انسان در فضا، ارزیابی چگونگی واکنش‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های فضا در حال گسترش است. پیشرفت پروازهای فضایی و فناوری شبیه‌سازی بر روی زمین، درک ما را از تأثیرات جاذبه بر روی زمین و بی‌وزنی در فضا بر روی میکروارگانیسم‌ها ارتقاء داده است. لازم به ذکر است که موارد متعددی وجود دارند که در آن‌ها اثرات ریزگرانش با استفاده از دستگاه‌های شبیه‌ساز، با تأثیرات حاصل از قرارگرفتن در معرض بی‌وزنی واقعی در طول پروازهای فضایی اندکی متفاوت باشد زیرا عوامل موثر دیگری غیر از بی‌وزنی مانند تابش کیهانی، ارتعاشات ایجاد شده توسط موشک و شتاب در هنگام پرتاب و فرود فضاپیما وجود دارند که می‌توانند بر رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها تأثیر بگذارند. با این حال به دلیل موانع موجود جهت انجام آزمایشات در شرایط بی‌وزنی واقعی مانند هزینه بسیار بالا و محدودیت تکرارپذیری، آزمون‌هایی که نیازمند بهره‌برداری از شرایط فضا هستند، ابتدا با استفاده از شبیه‌ساز-های زمینی آن انجام می‌پذیرند (۱۱). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پروازهای فضایی و آزمایش‌های شبیه‌ساز آن می‌توانند باعث تغییر در سرعت رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین تغییرات عمومی در بیان ژن، تنظیم عملکرد پروتئین‌ها و انتقال متابولیت‌ها در میکروارگانیسم‌ها شوند (۳ و ۱۷). تحقیقات وسیع ژنومیکس و پروتئومیکس که توسط هوآنگ فو و همکاران انجام پذیرفته است به بررسی دلایل افزایش بیان پروتئین نوترکیب بتاگلوکوروئیداز در شرایط SMG در میزبان *E. coli* پرداخته است. نتایج این پژوهش نشان داده است که ژن‌های مربوط به ریوزوم و RNA پلی‌مراز که مستقیماً با افزایش بیان پروتئین‌ها ارتباط دارند، در شرایط SMG افزایش بیان داشته‌اند (۱۴). همچنین ثابت شده است چاپرون‌های مولکولی که تاخوردن مؤثر پروتئین‌ها پس از ترجمه وگردهمایی پلی‌پپتیدها به کمک آن‌ها انجام می-



شکل ۱۱- تائید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلا تیگ. ستون ۱: فالکون نیمه پر با هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۲: فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط جاذبه طبیعی، ستون ۳: فالکون پر فاقد هوادهی در شرایط شبیه ساز ریز گرانش، ستون ۴: کنترل مثبت (پروتئین حاوی دنباله هیستیدینی)، ستون ۵: مارکر وزن مولکولی.

خوشبختانه فناوری DNA نوترکیب ابزاری مقرون به صرفه را در امر تولید پروتئین‌های مختلف به صورت تجاری فراهم آورده است و با کمک این فناوری، پروتئین‌های مختلف با کاربردهای صنعتی، دارویی، آنزیمی و کشاورزی، در میزان انبوه تولید می‌شوند (۶ و ۱۶). باکتری *E. coli* شناخته‌ترین و پرکاربردترین میزبان در زمینه تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد. اما علی‌رغم مزایای بسیار، کاربرد آن با مشکلاتی نیز روبرو است. مهمترین مانع، تشکیل اجسام توده‌ای حاصل از اتصالات نابجا میان پروتئین‌های تولید شده می‌باشد که باعث غیرفعال شدن محصول می‌گردند. تحقیقات گسترده به منظور برطرف نمودن این معضل در حال انجام می‌باشد که از جمله می‌توان به تغییر شرایط رشد باکتری، تغییر سطوح بیان پروتئین، تغییرات مهندسی بر روی توالی پروتئین مورد نظر و یا حتی بیان همزمان با چاپرون‌های مولکولی اشاره نمود (۱۰ و ۳۳). همچنین قرارگیری سلول‌ها تحت استرس-هایی چون تنش اسمزی و یا شوک حرارتی، حلالیت برخی پروتئین‌های نوترکیب را ارتقاء می‌بخشد (۹). علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در این مقوله، همچنان موانعی چند در

آن در شرایط جاذبه طبیعی همراه با هوادهی و در فاز نامحلول در حالت ریز گرانش ۵۰ درصد میزان آن در شرایط جاذبه طبیعی بود که در صورت اکسیژن رسانی امکان افزایش بیان محتمل بود. علاوه بر این در شرایط واقعی فضا با وجود برقراری بی وزنی، محیط فاقد اکسیژن نخواهد بود و لذا انتظار می‌رود تنفس هوازی انجام شده و بنابراین بیان پروتئین بالاتر باشد. Qi و همکاران در مطالعه-ای به سنجش میزان بیان پروتئین نوترکیب بتا-گلوکوزیداز در میزبان *P. pastoris* در شرایط ریز گرانش در دستگاه شبیه ساز (Low-shear modeled microgravity) LSMMG که در آن نیز امکان تبادل گازی وجود دارد پرداختند. نتایج حاکی از افزایش بیان ۲/۲۱ برابری پروتئین مذکور در شرایط ریز گرانش نسبت به شرایط جاذبه طبیعی بود (۲۵). به علاوه در پژوهشی که توسط هوانگفو و همکاران انجام پذیرفته است مشخص گردیده که بیان پروتئین نوترکیب بتا-گلوکوزیداز در شرایط ریز گرانش در دستگاه شبیه ساز HARV (High-aspect rotating-wall vessel) که امکان تبادل گازها وجود دارد، در میزبان *E. coli* تا حدود ۵۲ درصد نسبت به شرایط جاذبه طبیعی افزایش بیان داشته است (۱۳). بنابراین انتظار می‌رود با برقراری شرایط جهت انجام تبدلات گازی از طریق غشایی نیمه تراوا و یا استفاده از بیوراکتور در شرایط ریز گرانش، همچنین تغییر میزبان بیانی به میزبانی با شرایط بی هوادی اجباری، بتوان بر مشکل عدم اکسیژن رسانی غلبه نمود و به بررسی اثر یک جانبه ریز گرانش بر میزان بیان پروتئین نوترکیب پرداخت (۱۹). در این مطالعه مشاهده گردید که بیشتر پروتئین *EIT* نوترکیب در فاز محلول قرار گرفته بود به نحوی که در شرایط جاذبه طبیعی، میزان پروتئین بیانی در حالت نامحلول، ۸۳ درصد میزان پروتئین محلول بود اما این نسبت در ریز گرانش به ۶۸ درصد کاهش یافت. همچنین در شرایط ریز گرانش، نسبت پروتئین نوترکیب مورد نظر که در فاز محلول قرار گرفته بود، نزدیک به ۶۰ درصد پروتئین کل بود (مجموع محلول و نامحلول) در حالی که این

پذیرد، در شرایط SMG افزایش بیان را نشان داده‌اند. علاوه بر این فعالیت برخی آنزیم‌های تولید شده در شرایط SMG، بسیار بیشتر از شرایط جاذبه طبیعی بوده است (۱۳ و ۵). باتوجه به شواهد فوق و نیاز مبرم به تولید پروتئین‌های نوترکیب با ویژگی‌های کمی و کیفی بالاتر و به دلیل معضلات پیش رو در درمان آنتی بیوتیکی عفونت حاصل از باکتری *E. coli* آنتروهوموراژیک سویه O157:H7 (EHEC)، در این پژوهش اقدام به بررسی تأثیر شرایط ریز گرانش بر میزان و کیفیت پروتئین نوترکیب *EIT* به عنوان یکی از کاندیدهای حفاظت بخش واکسن علیه باکتری مذکور نمودیم. باکتری *E. coli* یک باکتری هوازی-بی هوادی اختیاری بوده و به عنوان میزبانی تولید کننده، هم در شرایط حضور اکسیژن و هم عدم حضور آن، ادامه حیات داده و از انرژی حاصل از شکستن قند استفاده می-نماید. میزان انرژی آزاد شده از شکستن یک مولکول گلوکز در زمان در دسترس بودن اکسیژن نسبت به نبود آن، در حدود ۱۸ برابر بیشتر می‌باشد (۲۱). به دلیل نیاز به انرژی بسیار بالا جهت بیان پروتئین، در دسترس بودن اکسیژن، فاکتوری تأثیر گذار در بازده تولید است به نحوی که در این مطالعه با قرار دادن باکتری در ظرف حاوی محیط کشت با درب نفوذ پذیر و درون انکوباتور شیکردار، بیان پروتئین بیشتری بود اما به دلیل چرخش دستگاه کلینواست، لاجرم درب ظرف حاوی باکتری بسته بوده و امکان اکسیژن رسانی وجود نداشت. علاوه بر این به منظور غلبه بر نیروی تنش برشی برای برقراری شرایط ریز گرانش، ظرف محیط کشت باید فاقد هر گونه فضای خالی (حباب) می‌بود. در این شرایط پس از گذشت مدت زمانی اندک، تمامی اکسیژن محلول در محیط کشت مصرف شده و گلوکز، به جای ورود به چرخه کربس، به سمت گلیکولیز رفته که بازده انرژی بسیار پایین تری دارد. از این رو بیان پروتئین در شرایط بدون هوادهی، باید بسیار کم می‌بود. اما مشاهده نمودیم که میزان این پروتئین نوترکیب در فاز محلول در حالت ریز گرانش حدود ۶۰ درصد میزان

پتانسیل‌های جدید به منظور افزایش تولید پروتئین‌های نوترکیب فعال از نظر زیستی و تجاری به کار رود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و پژوهشگاه هوافضا جهت انجام آزمایشات قدردانی می‌گردد. منابع مالی این پژوهش توسط محققین تامین گردیده است.

نسبت، در شرایط جاذبه طبیعی، ۵۴/۶ درصد ارزیابی شد. این موضوع نشان داد که در شرایط ریز گرانش، پروتئین EIT بیشتر در فاز محلول قرار گرفته که این امر، در تخریب این پروتئین نوترکیب نسبتاً سنگین از باکتری بسیار مهم می‌باشد. نتایج حاصل از پژوهش پیش رو نشان دادند که ریز گرانش به عنوان محیطی با شرایط ویژه، جهت افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب قابل بررسی و آزمون-های پیشرفته‌تر می‌باشد و درک چگونگی تأثیر جاذبه بر ترجمه و تاخوردگی پروتئین‌ها می‌تواند برای کشف

منابع

- Harrison, R.G., and Bagajewicz, M.J., 2015. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Insoluble Proteins*, PP: 403-408.
- Hayat, S.M., Farahani, N., Golichenari, B., and Sahebkar, A., 2018. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), PP: 718-725.
- Huang, B., Li, D.G., Huang, Y., and Liu, C.T., 2018. Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism. *Military Medical Research*, 5(1), PP: 1-14.
- Huang, Y., Gou, X., Hu, H., Xu, Q., Lu, Y., and Cheng, J., 2012. Enhanced S-adenosyl-l-methionine production in *Saccharomyces cerevisiae* by spaceflight culture, overexpressing methionine adenosyltransferase and optimizing cultivation, *Journal of applied microbiology*, 112(4), PP: 683-694.
- Huangfu, J., Kim, H.S., Xu, K., Ning, X., Qin, L., Li, J., and Li, C., 2020. Omics analysis reveals the mechanism of enhanced recombinant protein production under simulated microgravity. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 30 p.
- Huangfu, J., Qi, F., Liu, H., Zou, H., Ahmed, M.S., and Li, C., 2015. Novel helper factors influencing recombinant protein production in *Pichia pastoris* based on proteomic analysis under simulated microgravity. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(2), PP: 653-665.
- Khanifar, J., Hosseini, R.H., Kazemi, R., Ramandi, M.F., Amani, J., and Salmanian, A.H., 2015. Production of recombinant protein in *Saccharomyces cerevisiae* under simulated microgravity. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(1), PP: 43-51.
- Bollag, D., Michael, D., and Stuart, J., 1996. *Protein methods 2nd Ed*, A John Willey and Sons. Inc. Pub., New York.
- Carr, D.W., and Scott, J.D., 1992. Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends in biochemical sciences*, 17(7), PP: 246-249.
- Clarke, A. H., Just, K., Krzok, W., and Schönfeld, U., 2013. Listing's plane and the 3D-VOR in microgravity—The role of the otolith afferences, *Journal of Vestibular Research*, 23(2), PP: 61-70.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., and Helling, R.B., 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), PP: 3240-3244.
- Darvishi, F., 2020. Screening of New Microorganisms and Their Useful Genes: From Traditional Methods to Metagenomics. *Iranian Journal of Biology*, 1(1), PP: 43-51.
- Fabriki Ourang, S., 2018. Strategies required for expression and production of recombinant proteins in plants and their purification, *Iranian Journal of Biology*, 2(3, 4), PP: 121-130.
- G Willaert, R., 2013. The growth behavior of the model eukaryotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* in microgravity. *Current Biotechnology*, 2(3), PP: 226-234.
- Gitai, Z., and Shapiro, L., 2003. Bacterial cell division spirals into control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), PP: 7423-7424.

- β -D-glucuronidase production under low-shear modeled microgravity in *Pichia pastoris*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(4), PP: 505-511.
26. Rad, H.S., Mousavi, S.L., Rasooli, I., Amani, J., and Nadooshan, M.R.J., 2013. EspA-Intimin chimeric protein, a candidate vaccine against *Escherichia coli* O157: H7. *Iranian journal of microbiology*, 5(3), 244 p.
 27. Rahjerdi, A.K., Jafari, M., Motamedi, M.J., Amani, J., and Salmanian, A.H., 2019. Immunogenic Evaluation of Bivalent Vaccine Candidate against Enterohemorrhagic and Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Immunology*, 16(3), PP: 200-211.
 28. Rea, G., Cristofaro, F., Pani, G., Pascucci, B., Ghuge, S.A., Corsetto, P.A., Imbriani, M., Visai, L., and Rizzo, A.M., 2016. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. *Journal of proteomics*, 137, PP: 3-18.
 29. Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., and Rosini, R., 2018. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: Insights for vaccine development, *Frontiers in microbiology*, 9, 440 p.
 30. Saarinen, M.A., and Murhammer, D.W., 2000. 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*, 36(6), PP: 362-366.
 31. Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A.H., Mousavi, S.L., Nazarian, S., and Amani, J., 2017. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157: H7 risk in animals. *Microbial pathogenesis*, 103, PP: 186-195.
 32. Sahshorpour, M., Amani, J., Jafari, M., and Salmanian, A.H., 2014. Expression of recombinant chimeric EspA-intimin protein in *Nicotiana tobaccum* for oral vaccine development. *Journal of Plant Genetic Researches*, 1(1), PP: 77-94.
 33. Schlegel, S., Rujas, E., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., Luirink, J., and De Gier, J.W., 2013. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial cell factories*, 12(1), PP: 1-12.
 34. Senatore, G., Mastroleo, F., Leys, N., and Mauriello, G., 2018. Effect of microgravity & 2019. Prevention of EHEC infection by chitosan nano-structure coupled with synthetic recombinant antigen. *Journal of microbiological methods*, 157, PP: 100-107.
 16. Klaus, A., Saga, Y., Taketo, M.M., Tzahor, E., and Birchmeier, W., 2007. Distinct roles of Wnt/ β -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), PP: 18531-18536.
 17. Limbach, C., Hauslage, J., Schäfer, C., and Braun, M., 2005. How to activate a plant gravireceptor. Early mechanisms of gravity sensing studied in characean rhizoids during parabolic flights. *Plant Physiology*, 139(2), PP: 1030-40.
 18. Mühlen, S., and Dersch, P., 2020. Treatment Strategies for Infections With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(10), 169 p.
 19. Muntari, B., Amid, A., Mel, M., Jami, M. S., and Salleh, H. M., 2012. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB express*, 2(1), PP: 1-9.
 20. Navran, S., 2007. Rotary bioreactor for recombinant protein production, *Cell Technology for Cell Products* Springer, PP: 567-569.
 21. Nelson, D.L., Lehninger, A.L., and Cox, M.M., 2008. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
 22. Nickerson, C.A., Ott, C.M., Wilson, J.W., Ramamurthy, R., and Pierson, D.L., 2004. Microbial responses to microgravity and other low-shear environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), PP: 345-361.
 23. Nurjayadi, M., Afrizal, R., Hardianto, D., and Agustini, K., 2019. Variations of binding, washing, and concentration of imidazole on purification of recombinant Fim-C Protein *Salmonella typhi* with Ni-NTA Resin, In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1402, No. 5, 055055 p). IOP Publishing.
 24. Oliveira, A.F., Cardoso, S.A., Almeida, F.d., de Oliveira, L.L., Pitondo-Silva, A., Soares, S. G., and Hanna, E.S., 2012. Oral immunization with attenuated *Salmonella* vaccine expressing *Escherichia coli* O157: H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice. *Microbiol Immunol*, 56(8), PP: 513-522.
 25. Qi, F., Kaleem, I., Lv, B., Guo, X., and Li, C., 2011. Enhancement of recombinant

37. Warr, A.R., Kuehl, C.J., and Waldor, M.K., 2021. Shiga toxin remodels the intestinal epithelial transcriptional response to Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 17(2), e1009290 p.
38. Xiang, L., Qi, F., Dai, D., Li, C., and Jiang, Y., 2010. Simulated microgravity affects growth of *Escherichia coli* and recombinant β -D-glucuronidase production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(3), PP: 654-661.
- space radiation on microbes. *Future microbiology*, 13(07), PP: 831-847.
35. Thuthikkadu Indhuprakash, S., Karthikeyan, M., Gopal, G., Ambi, S.V., Sekaran, S., Palaniappan, B., and Diraviyam, T., 2021. Antibody therapy against antibiotic-resistant diarrheagenic *Escherichia coli*: a systematic review. *Immunotherapy*, 13(15), PP: 1305-1320.
36. United Nations, 2013. Teacher's Guide to Plant Experiments in Microgravity, Human Space Technology Initiative.

Expression of recombinant EIT protein under simulated microgravity conditions

Salavatifar M.¹, Kashanpoor S.² and Salmanian A.H.³

¹ Dept. of Space Biology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The pathogenic *E. coli* O157: H7 is capable of causing a wide range of complications, such as dysentery and hemolytic uremic syndrome. Due to the difficulties in antibiotic treatment, immunization seems to be the most appropriate way to fight this bacterium. Intimin, Tir, and EspA proteins are the three major proteins involved in the binding of the bacterium to the superficial epithelium of the gastrointestinal tract. By inhibiting the binding of these proteins, in the early stages of bacterial attack, colonization is limited and disease is inhibited. Selecting the effective portions of these proteins and producing a recombinant chimeric protein by binding them together, researchers have developed a suitable and effective immunogen to prevent the disease. Therefore, achieving high amounts of recombinant protein, along with maintaining its quality and efficiency, is very important. In the present study, due to the increase in the quantitative and qualitative expression of some recombinant proteins under gravity removal conditions, the expression of EIT recombinant proteins under simulated microgravity conditions on a clinostat device was investigated. After optimizing the expression conditions and confirming the recombinant protein using immunological methods, its expression was induced in weightlessness simulator conditions. After purification of the protein by chromatographic column, its amount was measured by standard methods. The results showed that despite the decrease in expression under weightlessness, probably due to lack of proper aeration of the culture medium, recombinant protein was still produced with appropriate quality under weightlessness.

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