مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱

Research Article
مقاله تحقیقی

بیان آلبومین سرم انسانی نوترکیب در باکتری *اشرشیا کلی سویه* (*BL21(DE3*)

فاطمه غفاری [۱]، فرناز خیر اندیش [۲]، بهرا م کاظمی [۳ و ۴]، محمد داود غفاری [۵]، مژگان بنده پور [*۶ و ۷]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، خرم آباد، ایران
[۳] استاد ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی ومول‌کولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴] استاد ، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۵] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۶] استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی ومولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۷] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلبومین سرم انسان از مهم ترین ترکیبات سیستم گردش خون می باشد. این پروتئین حامل بسیاری از هورمون ها و متابولیت ها در بدن بوده و در تثبیت حجم خون و درمان انواع سوختگی ها مؤثر می باشد. چون تهیه آن از پلاسمای خون پرهزینه بوده و همراه با آلودگی به پاتوژن ها ی مختلف است، تولید آن توسط روش های بیوتکنولوژی ضروری به نظر می رسد.

مواد و روش ها: ژن آلبومین سرم انسان (HSA) براساس توالی موجود در بانک ژن سنتز شد و بعد از کلون در وکتور pET22b به سلول پذیرای *BL21 (DE3)* انتقال یافت.کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب، کشت داده شد و هنگامی که به OD_{600} = 0.6 رسید، با ۱/۵ mM IPTG القا شد. سپس در ساعات مختلف رسوب گیری انجام شد و روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت . تولید پروتئین با روش وسترن بلات تائید گردید و تخلیص پروتئین توسط کروماتوگرافی تمایلی انجام شد.

یافته ها: دراین مطالعه آلبومین انسانی در فضای پری پلاسمیک باکتری تولید شد. بیشترین میزان پروتئین نوترکیب تولید شده ، ۲۴ ساعت پس از القاء بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه آلبومین انسانی به صورت نوترکیب در اشرشیا کلی تولید شد.

کلمات کلیدی: آلبومین سرم انسانی، *BL21(DE3)* ، pET22b

مقدمه

آلبومین سرم انسانی (HSA) فراوان ترین پروتئین موجود در پلاسمای خون انسان است (۴) و توسط کبد سنتز می شود (۱۲). این پروتئین حدود ۶۰ ٪ از کل پروتئین های پلاسما را به خود اختصاص داده و نیمه ی عمر آن حدود ۲۰روز است (۹). آلبومین از معدود پروتئین هایی است که فاقد کربوهیدرات بوده، از یک رشته پلی پپتیدی با ۵۸۵ آمینو اسید تشکیل شده (۱۷) که وزن مولکولی KDa ۶۶/۵ دارد و مسئول تنظیم فشار اسمزی خون می باشد (۱۳). آلبومین ازنظر ساختاری متشکل از سه دومین است، این مناطق از لحاظ ساختمانی به یکدیگر شباهت دارند و هر کدام از این سه دومین، واجد۲ساب دومین هستند (۲). ژن آلبومین انسانی در کروموزوم ۴ انسان در ناحیه q(11-12) قرار گرفته است، دارای ۱۶۹۶۱ نوکلئوتید است و از ۱۴ اینترون و ۱۵ اگزون تشکیل شده است (۱۱،۱۰). از آن جایی که امروزه آلبومین سرم انسانی توسط تکنیک های معمولی که شامل استخراج آن از پلاسمای خون اهداکنندگان می باشد، تهیه می شود و این کار بسیار پر هزینه بوده و خطر آلودگی توسط پاتوژن های انسانی را افزایش می دهد، به همین

آدرس نویسنده مسئول:مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی ومولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران- ایران
Email:bandehpour@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۱۶
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۶/۲۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]

دلیل تولید آن توسط تکنولوژی مهندسی ژنتیک ضرورت پیدا کرده است (۱)، بنابراین این مطالعه به منظور تولید آلبومین انسانی نوترکیب در باکتری *اشرشیا کلی* سویه *BL21 (DE3)* انجام شد.

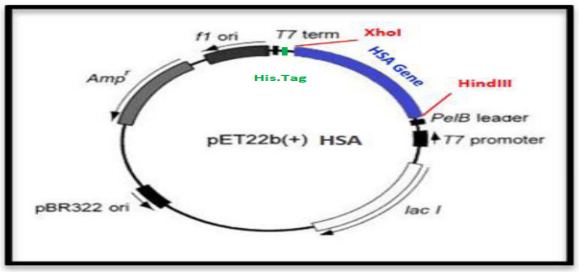
مواد وروش ها

سنتز ژن

ORF کد کننده آلبومین بر اساس ژن ثبت شده در بانک ژن (Accession number:NM-000477.5) توسط شرکت سیناژن سنتز شد و کلون شده به صورت پلاسمید pGE-30244- Human Albumin تحویل گردید. در انتهای 3` ژن جایگاه شناسایی آنزیم *XhoI* و سمت 5` آن جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* تعبیه شده بود.

ساب کلونینگ در وکتور بیان

وکتور بیانی pET22b که حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین است به عنوان وکتور نهایی در نظر گرفته شد. پلاسمید-pGE 30244-Human Albumin توسط آنزیم های *XhoI* و *HindIII* (ساخت شرکت فرمنتاز) هضم گردید ژن آلبومین انسانی توسط کیت خالص سازی شد و در مرحله بعدی، واکنش اتصال بین این وکتور و ژن حاصل از هضم آنزیمی صورت گرفت. (HSA insert (0/1µg) درون وکتور pET22b (2µg) توسط آنزیم T_4 *DNA Ligase* (2u/µl)قرار گرفت (شکل۱).



شکل۱- نقشه وکتور بیانی pET22b و جایگاه قرار گرفتن ژن HSA درون آن.

ترانس فورماسیون و غربالگری سلول های *(BL21)DE3* حاوی ژنHSA

از باکتری *BL21(DE3)* سلول مستعد تهیه شد و واکنش ترانسفرماسیون انجام گرفت باکتری های ترانسفورم شده، جهت غربالگری (وجود یا عدم وجود پلاسمید نوترکیب در درون سلول باکتری)، بر روی پلیت های آگار حاوی آمپی سیلین پخش شدند و نهایتاً بر روی پلیت تعدادی کلونی مشاهده شد. تک کلونی ها جهت کشت شبانه به محیط LB حاوی آمپی سیلین انتقال یافتند و سپس استخراج پلاسمید با روش الکالین فسفاتاز انجام گرفت (۶). تأیید پلاسمید نوترکیب با واکنش PCR انجام گرفت.

بیان آلبومین

یک کلنی باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شد و وقتی به $OD_{۶۰۰}$=۰/۶ رسید، توسط IPTG ۱/۵ mM القاء شد و در ساعات ۰،۳، ۵ و۲۴ نمونه گیری انجام شد. نمونه ها رسوب گیری شدند و بعد از لیز باکتری و رسوب پروتئین با استون بر روی ژلSDS-PAGE ۱۰٪ الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل با استفاده از کوماسی بلو انجام گرفت (۱۴).

آنالیز پروتئین با روش وسترن بلات

بعد از لود کردن نمونه ها بر روی ژل پلی آکریل آمید و خاتمه الکتروفورز باند های پروتئین توسط دستگاه Semi Dry و با برقراری جریان الکتریسیته به غشا نیتروسلولز انتقال یافتند (ترکیب بافر انتقال، (۰/۲۵ M) Tris-base، (۰/۱۹۲ M) Glycine ، (۲۰Methanol (%) و pH=۸ بود) سپس غشاء در محلول بلوکه کننده، حاوی شیر بدون چربی ۳٪ و به مدت ۱ ساعت در شیکر با rpm۷۰ نگهداری شد. در مرحله بعد آنتی بادی موشی مخصوص His.Tag (ساخت شرکت Abcam) ، با رقت ۱/۱۰۰۰ اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار، انکوبه گردید.

آنتی بادی ثانویه موشی که با HRP(horseradish peroxidase) کونژوگه شده بود ، با رقت ۱/۱۰۰ به آن اضافه شد و بعد از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت و طی مراحل آشکارسازی، واکنش

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]

بین آنتی بادی و سوبسترا ((M) Tris۱ ، (۴۰٪)H2O2 و D.A.B (0.6 gr) انجام شد و باند های پروتئین ظاهر شدند.

تخلیص پروتئین با کروماتوگرافی Ni-TED

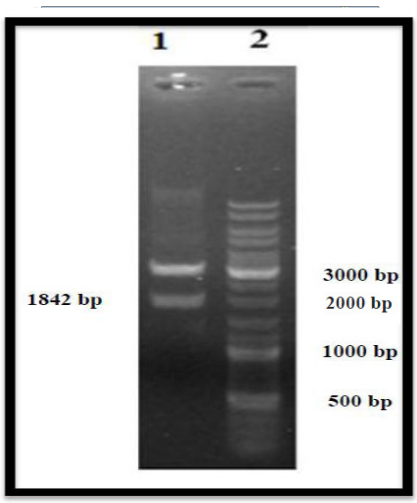
رسوب باکتری در Periplasmic extraction buffer((۲۰۰ mM) Tris-HCl، Sucrose (%) ۲۰، EDTA (۱ mM) و pH=۸) به مدت ۴۵ min روی یخ نگهداری شد و به آرامی شیک شد سپس سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰دقیقه با ۱۲۰۰ rpm در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد، سوپ حاصل جمع آوری شده و دیالیز شد (دیالیز با بافر(۵۰ mM) Tris-HCl، (۱ M) NaCl و pH= ۷ انجام شد) (۱۶). عصاره پری پلاسمیک شامل پروتئین نوترکیب با ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-TED (His.Tag) ساخت شرکت (Macherey-nagel) تخلیص شد. پروتئین نوترکیب بعد از تخلیص مجددا» با روش وسترن بلات تایید گردید.

مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-TED.

ابتدا ستون کروماتوگرافی Ni-TED حاوی رزین های مخصوص His.Tag دو مرتبه با Washing buffer((۵۰ mM) NaH2pO4، (۳۰۰ mM) NaCl و pH= ۸) شستشو داده شد. نمونه های آماده شده به ستون اضافه شدند تا محتویات ستون به آهستگی خارج شود (این مرحله دوبار تکرار شد). این محتویات شامل پروتئین های باکتری و لاشه سلولی است که خارج شدند. در ادامه ستون را با ۱۰ cc بافر شستشو دهنده ها شستشو داده شد (۱۰برابر حجم رزین داخل ستون از بافر شستشو دهنده استفاده می شود).cc ۲ محلول Elutiing buffer ((۵۰ mM) NaH2pO4 ، (۳۰۰ mM) NaCl ، (۲۵۰ mM) Immidazole و۸ = pH) به ستون اضافه شد و محتویات ستون در لوله های استریل جمع آوری شدند (این محتویات شامل پروتئین آلبومین تخلیص شده است). تخلیص پروتئین در شرایط Native انجام شد.

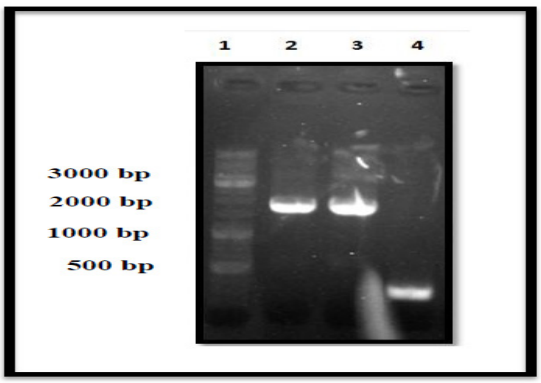
یافته ها

پلاسمید pGE-30244-Human Albumin سنتز شده با آنزیم های محدودگر *HindIII* و*XhoI* هضم گردید، ژن آلبومین به طول ۱۸۴۲ جفت نوکلئوتید در شکل شماره ۲ مشاهده می شود. ژن آلبومین در پلاسمید pET22b ساب کلون شد و تایید آن با واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی این پلاسمید انجام گرفت (شکل ۳).



شکل۲- الکتروفورز روی ژل آگاروز۰/۸درصد

ستون ۱ : پلاسمید هضم شده با آنزیم های *HindIII* و*XhoI* (باند ۱۸۴۲ bp مربوط به ژن HSA و باند دیگر مربوط به پلاسمید هضم شده می باشد) ستون ۲ : مارکر وزن ملکولی ۱۰۰۰ bp



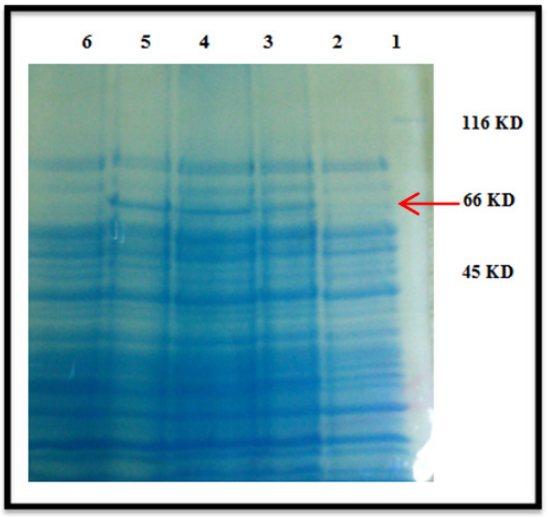
شکل۳- الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA

ستون ۱ : مارکر وزن ملکولی ۱۰۰۰bp ستون۲و۳: محصول PCR پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA با پرایمرهای اختصاصی پلاسمید. ستون۴ : محصول PCR پلاسمید pET22b (کنترل منفی).

شکل ۴ نشان دهنده الکتروفورز ژل ۱۰٪SDS-PAGE است. باند پروتئینی ۶۶کیلو دالتونی در ستون های ۳،۴،۵ مربوط به پروتئین آلبومین انسانی نوترکیب می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

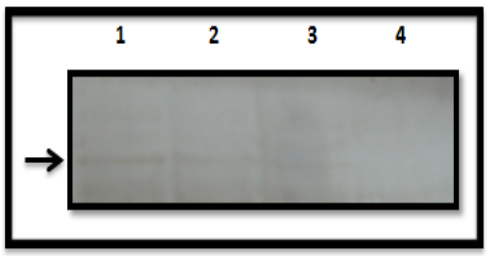
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]



شکل۴- الکتروفورز پروتئین HSA روی ژل ۱۰٪SDS-PAGE .

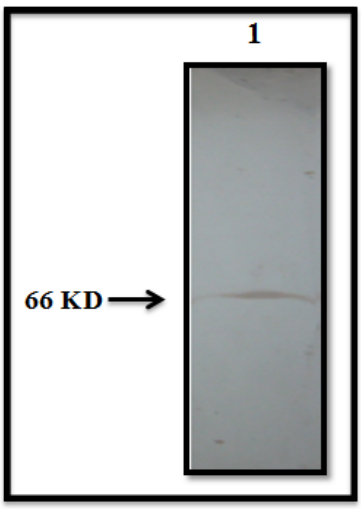
ستون۱: مارکر مخصوص SDS-PAGE ستون۲: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA در زمان صفر ستون۳: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیبpET22b/HSA سه ساعت بعد از القا ستون۴: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب/pET22b HSA پنج ساعت بعداز القا ستون۵: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA بیست وچهار ساعت بعداز القا ستون۶: لیز سلول باکتریایی فاقد پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA

شکل ۵ واکنش وسترن بلات را نشان می دهد، بیشترین میزان بیان rHSA، ۲۴ ساعت بعد از القا با ۱/۵ mM IPTG در دمای ۳۷درجه سانتی گراد مشاهده شد. غلظت پروتئین نوترکیب در این زمان با استفاده از دستگاه Biophotometr درOD_{280}، ۸۵ میکروگرم در میلی لیتر (در واحد حجم پروتئین) اندازه گیری شد. در حالی که در زمان های ۳و۵ میزان غلظت پروتئین کمتر از این بود.



شکل ۵- وسترن بلات. ستون ۱: سلول *BL21* حاوی pET22b/HSA ۲۴ ساعت بعد از القاء ستون ۲ : سلول *BL21* حاوی pET22b/HSA ۵ ساعت بعد ارالقاء ستون ۳ : سلول *BL21* حاوی pET22b/HSA ۳ ساعت بعد از القاء ستون ۴ : سلول *BL21* فاقد پلاسمید نوترکیب (کنترل منفی)

بعد از خالص سازی پروتئین HSA، مجددا تست وسترن بلات انجام گرفت. آلبومین خالص شده به صورت یک باند روی غشاء نیترو سلولز در ناحیه ۶۶ کیلو دالتون ظاهر گردید (شکل ۶).



شکل ۶- وسترن بلات پروتئین تخلیص شده. ستون ۱: پروتئین نوترکیب HSA خالص شده.

بحث

امروزه آلبومین سرم انسانی از پلاسمای خون اهداکنندگان استخراج می شود. این کارپرهزینه است و خطرآلودگی با پاتوژن های انسانی را افزایش می دهد، به همین دلیل تولید آن توسط تکنولوژی مهندسی ژنتیک ضرورت پیدا کرده است (۱). تا کنون به منظور تولید پروتئین آلبومین نوترکیب و هم‌چنین بهینه سازی شرایط تولید از مخمر *متیلوتروف هانسونلاپلی مورفا* (۵) و هم چنین از مخمر *Pichia Pastoris* به عنوان میزبان استفاده شده است (۷). به کاربردن میزبان باکتریایی(*BL21*) در این بررسی راهی ارزان و سریع برای تولید پروتئین های آلبومین نوترکیب بود و چون آلبومین انسانی یک پروتئین غیر گلیکوزیله است بنابراین، این ویژگی تا حدی مشکلات ناشی از بیان را (تغییرات پس از ترجمه ای مانند گلیکوزیلاسون و...) کاهش خواهد داد. اعتقاد بر این بود که rHSA فقط در فضای سیتوپلاسمی بیان می شود و بیان آن در فضای پری پلاسمی ناچیز است به طوری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]

که در وسترن بلات قابل شناسایی نمی باشد (۱۵،۳). در این مطالعه آلبومین در فضای پری پلاسمی بیان شد و با وسترن بلات شناسایی شد و حضور پروتئین نوترکیب در فضای پری پلاسمیک با استفاده از روش Periplasmic extraction اثبات شد. در بررسی های قبلی غلظت rHSA تخلیص شده از فضای سیتوپلاسمیک باکتری ۰/۰۰۲ میلی گرم در لیتر گزارش شد (۹). در این بررسی،غلظت آلبومین نوترکیب تولید شده بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان القا، ۰۸۵/ میلی گرم در لیتر بود. در گزارشات قبلی برای القای سلول های BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب pET22b/HSA از IPTG۱ میلی مولار استفاده می شد (۸)، در این مطالعه القای پروموتور با ۱/۵ میلی مولار IPTG نتیجه مطلوب تری داشت و پروتئین نوترکیب در فضای پری پلاسمیک باکتری تولید شد. در تحقیقی که ما انجام دادیم و باتوجه به تجهیزات ساده مورد استفاده در آن، این تحقیق از امکان تکرارپذیری بالابرخوردار بوده و نتایج قابل ملاحظه ای را برای تحقیقات بعدی فراهم می کند. مطالعات دقیق تر در مقیاس نیمه صنعتی و استفاده از فرمانتور و بهینه سازی شرایط کشت باعث افزایش بیان آلبومین انسانی خواهد شد.

تشکر و قدردانی

هزینه این مطالعه توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تامین گردید و کارهای آزمایشگاهی آن در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]

منابع

(1) Abbasi ML , Haghighi MM , Ghamari AR , Adibi Motlagh B , Rezvan H , Piontek M , Hellweg S , Pourfathollah AA , Kahrizi K , Najmabadi H .Expression of recombinant human serum albumin in the methylotrophic yeast; Hansenula polymorpha .blood, 2005; 2 :11-17. (Persian in full text)

(2) Dockal M ,Carters DC and Ru ker F .The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin. JBC, 1999; 274:29303–29310.

(3) Hannig G ,Makrides SC .Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli . j.tibtech,1998; 16(2): 54-60.

(4) Hesami Takallu S ,Rezaei Tavirani M ,Kalantari SH ,Amir Bakhtiarvand M, Mahdavi SM . Co-amoxiclav Effect on the Structural and Binding Properties of human serum albumin .IJPR, 2010; 9(3): 251-257.

(5) Kang H ,Kang W ,Hong WK ,Kim MW ,Kim JY ,Sohn JH ,Choi ES ,Choe KB ,Rhee SK .Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in Hansenula polymorpha DL-1 .IJBBR, 2001;76:175-185.

(6) Kazemi B ,Tohidi F ,Bandehpour M ,Yarian F .Molecular Cloning, Expression and Enzymatic Assay of Pteridine Reductase 1 from Iranian Lizard Leishmania .IBJ, 2010; 14(3): 97-102.

(7) Kobayashi K ,Kuwae Sh ,Ohya T ,Ohda T ,Ohyama M ,Ohi H ,Tomomitsu K and Ohmura T .High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast Pichia pastoris with minimal protease production and activation .JBB, 2000; 89:155-61.

(8) Lawn RM ,Adelman J ,Bock SC ,Franke AE ,Houck CM ,Najarian RC ,Seeburg PH ,Wion KL .The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in E. coli .NAR, 1981; 9(22): 6103-6114.

(9) Mavituna M . Production of recombinant Human Serum Albumin in transgenic plants and plant cells. Tag der mundlichen Prufung, 2005; 27: 186-206.

(10) Nishio H ,Dugaiczyk A .Complete structure of the human α-albumin gene, a new member of the serum albumin multigene family .BJ, 1996; 93:7557-7561.

(11) Phillip P ,Minghetti S ,Duane E ,Ruffner S ,Wun-Jing K ,Olivia E ,James W ,Wanda G and Achilles D. Molecular Structure of the Human Albumin Gene Is Revealed by Nucleotide Sequence within q11-22 of Chromosome 4 .JBC, 1986; 261: 6747-6757.

(12) Sabharwal N ,Icoz I ,Saxena D ,Stotzky G .Release of the recombinant proteins, human serum albumin, b-glucuronidase, glycoprotein B from human cytomegalovirus, and green fluorescent protein, in root exudates from transgenic tobacco and their effects on microbes and enzymatic activities in soil .PPB, 2007; 45: 464-469.

(13) Shingo O ,Masahiro T ,Katsuhiko S ,Katsutoshi Y .Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: Productioof recombinant human serum albumin .JB, 2007;128: 531–544.

(14) Smith B .Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins .Meth Mol Biol, 1984; 1:63-73.

(15) Talmadge K ,Gilbert W. Cellular location affects protein stability in Escherichia coli. PNAS, 1982; 79(6): 1830-1833.

(16) Wang WW ,Das D ,Mavanur R .Biotin Carboxyl Carrier Protein Co-Purifies as a Contaminant in Core-Streptavidin Preparations .Mol Biotechnol, 2005; 31: 1073-6085.

(17) Yang F,Bian Ch ,Zhu L,Zhao G ,Huang Z ,Huang M .Effect of human serum albumin on drug metabolism:Structuralevidence of esterase activity of human serum albumin . JSB, 2007; 157: 348-355.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.5.9]