

تولید آلبومین سرم انسانی نوترکیب در مخمر متیلوتروف هانسونلا پلی مورفا

لیا عباسی محب^۱، مهدی منتظر حقیقی^۲، علیرضا قمری^۳، بهزاد ادیبی مطلق^۴، دکترحوری رضوان^۵، دکترمایکل پویتنک^۶، دکتراسفغان هل وگ^۷، دکترعلی اکبر پورفتح الله^۸، دکترکیمیا کهریزی^۹، دکترحسین نجم آبادی^{۱۰}

چکیده

سابقه و هدف

آلبومین عمده ترین پروتئین پلاسما می باشد. این پروتئین نه تنها به عنوان حامل بسیاری از ماکرومولکول ها در بدن نقش عمده ای ایفا می کند بلکه نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی دارد. امروزه از آلبومین در درمان خونریزی ها و سوختگی های شدید و هم چنین در درمان افراد مبتلا به کمبود آلبومین استفاده می شود. مصرف سالیانه آلبومین در دنیا حدود ۴۵۰ تن می باشد. به منظور برطرف کردن این نیاز و تولید آلبومین عاری از هرگونه آلودگی از روش های بیوتکنولوژی استفاده گردیده است.

در این تحقیق از مخمر هانسونلا پلی مورفا که امروزه در سطح وسیعی به منظور تولید پروتئین های هترولوگ به کار برده می شود، برای آلبومین انسانی نوترکیب استفاده گردیده است.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی (experimental) است. به منظور تولید پروتئین آلبومین نوترکیب و هم چنین بهینه سازی شرایط تولید از سوش RB-11 هانسونلا پلی مورفا به عنوان میزبان استفاده گردید. پلاسمید pFMPT-MFα حاوی cDNA آلبومین تحت کنترل پروموتور FMD با استفاده از روش الکتروپوریشن داخل میزبان شد و سپس تحت شرایط مختلف با بررسی پارامترهایی نظیر زمان انکوباسیون، محیط کشت، دما و مهارکننده های پروتئازی بیان آلبومین مورد بررسی قرار گرفت. آلبومین تولید شده با روش هایی هم چون الایزا، HPLC و Western Blot ارزیابی شد.

یافته ها

در طی این تحقیق چهارعامل مهم در بیان پروتئین آلبومین مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که از بین سه محیط derepression، YNB 1% Glycerol، YP 1% Glycerol، YNB 1% Glycerol with buffer، محیط کشت YNB 1% Glycerol with buffer و از بین سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد دمای ۳۷ درجه و از بین سه زمان انکوباسیون، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مدت ۴۸ ساعت با حضور آنتی پروتئازها بیشترین میزان تولید آلبومین به دست آمد.

نتیجه گیری

بالاترین میزان تولید شده تحت شرایط بهینه به دست آمده در مقیاس آزمایشگاهی، ۱۷/۶ mg/l را نشان داد. از سوی دیگر با استفاده از این سوش در شرایط نیمه صنعتی، میزان ۴۷۸ mg/l آلبومین تولید شد و این امر نشان دهنده آن است که می توان تولید پروتئین آلبومین را در شرایط انبوه ادامه داد.

کلمات کلیدی: آلبومین سرم انسانی، مخمر هانسونلا پلی مورفا، آلبومین نوترکیب

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد ژنتیک - مربی مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

۲- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

۳- کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، بخش تحقیق و توسعه

۴- Ph.D بیوشیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، بخش تحقیق و توسعه

۵- Ph.D ژنتیک - دانشگاه دوسلدورف آلمان

۶- Ph.D ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و دانشگاه تربیت مدرس

۷- متخصص اطفال - استادیار مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

۸- Ph.D ژنتیک ملکولی - سرپرست مرکز تحقیقات ژنتیک و دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

مقدمه

آلبومین سرم انسانی اصلی ترین ترکیب پروتئین پلاسما انسان است. این پروتئین از یک زنجیره پلی پپتیدی ۵۸۵ اسید آمینه ای فاقد قند به وزن ملکولی ۶۶/۵KD تشکیل شده است (۱).

این ملکول قطبی بوده و دارای سه ناحیه است (۲). میزان آلبومین در پلاسما $42 \pm 3/5 \text{ g/l}$ می باشد. HSA^۱ در کبد تولید شده و مسئول نگهداری فشار اسمزی خون است. آلبومین هم چنین به عنوان یک ناقل برای بسیاری از ملکول های کوچک عمل کرده و از نظر کلینیکی، برای درمان هیپوآلبومینمی در شوک های حاصل از ضربه استفاده می شود (۳، ۴، ۵).

امروزه آلبومین با استفاده از روش Cohn از پلاسما به دست می آید. از این رو به دلیل استفاده از منابع خونی، همواره یک خطر بالقوه برای آلودگی HSA با پاتوژن های خون نظیر ویروس های ایدز و هپاتیت B وجود دارد. علاوه بر آن در بسیاری از کشورها از جمله ژاپن، منابع پلاسمایی محدود است. به طور مثال در این کشور فقط ۲۶ درصد آلبومین تولید شده از منابع پلاسمای داخلی تهیه می شود (۶).

بنابراین با توجه به این محدودیت ها و به منظور امکان دستیابی به مقادیر بیشتر و هزینه کمتر، دستیابی به یک روش جایگزین صنعتی و بی خطر برای تولید آلبومین، مورد نظر محققان اکثر کشورهای دنیا از جمله ایران قرار گرفته است تا نه تنها بتوان نیاز داخلی را به این محصول پر مصرف برطرف کرد بلکه زمینه صادرات آن نیز فراهم شود.

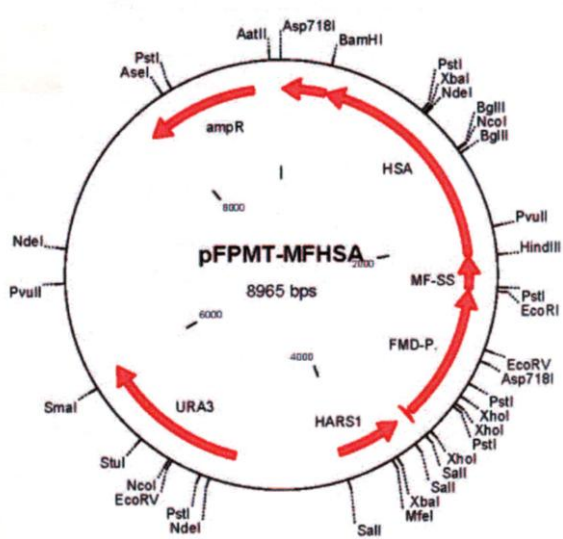
مصرف سالیانه آلبومین در دنیا ۴۵۰ تن است که می تواند یک تضمین خوب برای بازار مصرف محصول باشد. به منظور بر طرف کردن این نیاز و تولید آلبومین عاری از هرگونه آلودگی، از روش های بیوتکنولوژی استفاده گردیده است (۷).

در این راستا این تحقیق با هدف تولید آلبومین نو ترکیب با استفاده از مخمر هانسونلا پلی مورفا انجام گرفت و هم چنین اثر پارامترهای موثر در میزان بیان HSA در این مخمر ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

مشخصات سوش و پلاسمید

مخمر استفاده شده در این مطالعه، هانسونلا پلی مورفا RB-۱۱ اگزوتروفیک به یوراسیل بود که از سوش وحشی ATCC35438 به دست آمده است (۸). پلاسمید pFPMTMFaHSA دارای ژن HSA برای بیان پروتئین آلبومین می باشد که توسط محققان دانشگاه دوسلدورف آلمان طراحی شد. پلاسمید فوق دارای پروموتور FMD می باشد که قابل القا با متانول است. این پلاسمید دارای cDNA ژن HSA (1760pb)، ترمیناتور MOX (353bp) و قطعه سیگنال پپتید (255bp) مشتق از ساکارومیسس سرویزیه می باشد. این پلاسمید حاوی توالی HARS^۲ و مارکرهای انتخابی URA3 و amp^R است که از پلاسمید pFPMT121 مشتق شده است (شکل ۱).



شکل ۱: نقشه پلاسمید pFMT-MFa را نشان می دهد، شامل FMD (Fumarate Dehydrogenase) که نقش پروموتور را بر عهده دارد. توالی MFa (Mating Factor) به عنوان سیگنال پپتید، قطعه الحاق شده cDNA ژن آلبومین و ترمیناتور MOX هم چنین ژن یوراسیل و ژن مقاوم به آمپی سیلین بعنوان مارکر انتخابی و توالی HARS 1 به عنوان Ori در این پلاسمید قابل مشاهده است.

1- Human Serum Albumin

2- Hansenula Autonomus Replication Sequence

ترانسفورماسیون هانسونلا پلی مورفا و غربال سلول‌های ترانسفورم شده حاوی ژن HSA

ترانسفورماسیون هانسونلا پلی مورفا و پایدارسازی سلول‌های ترانسفورم شده طبق روش الکتروپوریشن انجام شد (۹). بعد از ترانسفورماسیون، سلول‌های ترانسفورم شده تا حدود ۸۰ بار طی مراحل متناوب کشت بدون تغییر شرایط تکثیر یافتند. پلاسمیدها به صورت ردیفی (سر به انتها) درون ژنوم مخمر الحاق شدند. به منظور حذف پلاسمیدهای غیرالحاقی، دو مرحله پایدارسازی تحت شرایط غیر انتخابی انجام شد.

در مرحله بعدی سلول‌های ترانسفورم شده که پلاسمید الحاقی ندارند از طریق فرآیند غربالی حذف شدند. سلول‌های ترانسفورم شده انتخابی بر روی محیط YPD [2% (v/w) peptone, 1% (v/w) Yeast extract, 2% (v/w) glucose] به منظور نگهداری کشت داده شدند (۱۰).

کشت درون فلاسک

برای بهینه سازی بیان HSA در هانسونلا پلی مورفا، چندین پارامتر مورد مطالعه قرار گرفت. این پارامترها عبارتند از محیط‌های کشت مختلف، دمای انکوباسیون، آنتی پروتئازها و زمان انکوباسیون. اثر تمام پارامترها برای بیان HSA هم به صورت مجزا و هم در ارتباط با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفتند.

محیط کشت و شرایط کشت

یک تک کلنی از سوش تولیدکننده HSA از پلیت Stock حاوی مخمر برداشته شد و درون ۳ میلی لیتر محیط YPD مایع کشت داده شد. این محیط‌ها در سه دمای مختلف ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شدند.

از این محیط‌ها برای تلقیح محیط‌های Derepression (YNB 1% Glycerol with phosphate 0.5M buffer, YNB 1% Glycerol without buffer, YP 1% Glycerol) استفاده شد. میزان رشد سلول‌ها از طریق اندازه گیری OD محیط کشت در طول موج ۶۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf مدل Biophotometr) مشخص

شد (OD=1 معادل ۰/۳g/l وزن خالص سلول‌های هانسونلا پلی مورفا است). به منظور جداسازی سلول‌ها، محیط‌های حاوی سلول‌های مخمر با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (HERMLE مدل ۳۲۰ Z) شدند و سپس رسوب سلولی با آب مقطر استریل مخلوط شد. از این سوسپانسیون سلولی به منظور تلقیح ۳ فلاسک ۵۰۰ میلی لیتر حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط‌های ذکر شده استفاده شد. این فلاسک‌ها به طور جداگانه در سه دمای مختلف ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار دار انکوبه شدند (۱۱).

متغیر دما

به علت سازگاری هانسونلا پلی مورفا با دامنه وسیعی از دما یعنی از ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد، سه دمای مختلف انکوباسیون (۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد) را هم به صورت مجزا و هم در رابطه با دیگر پارامترها مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲).

متغیر آنتی پروتئاز

مخلوط آنتی پروتئازی حاوی Pepestatin 1M، EDTA در 1μM Leupeptin، PMSF 200μM با تیتراهای مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۶۰، ۱/۸۰) به محیط‌های کشت اضافه شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت زمان انکوباسیون در ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد غلظت HSA مورد ارزیابی قرار گرفت (تمام آنتی پروتئازها از شرکت DAKO خریداری شده بود) (۷).

زمان انکوباسیون

سه زمان انکوباسیون مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به منظور دستیابی به بالاترین میزان HSA ترشحي بررسی شد.

آنالیز RNA با استفاده از RT-PCR

RNA مخمري توسط روش تریزول (با استفاده از کیت High isolation kit کمپانی Roche) جداسازی شد و به عنوان الگویی برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در یک مرحله انجام شد. قطعه 770bp cDNA ژن HSA با استفاده از

نمونه و عبور محلول شستشو (بافر فسفات pH=6/7 0/1M) استفاده شد.

جذب نوری پروتئین‌های موجود در نمونه در 280nm اندازه گیری و منحنی مربوطه رسم شد.

اندازه‌گیری آلبومین با روش Elisa

۱- لوله‌های حاوی محیط‌های کشت و سلول‌های مخمر به مدت ۱۰ دقیقه به منظور جدا کردن مایع رویی در دمای محیط با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند.

۲- مایع‌های رویی با PBS به نسبت‌های ۱/۱۰۰ یا ۱/۲۰۰ رقیق شدند.

۳- همچنین پروتئین استاندارد مطابق جدول با PBS رقیق شد (برای تهیه نمودار استاندارد).

۴- مرحله Coating، ۵۰µl مایع رویی رقیق شده، استاندارد و بلانک در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد.

۵- پلیت به مدت یک شبانه روز بدون حرکت در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

۶- محلول رویی پلیت دور ریخته شد و چاهک‌ها با ۲۰۰µl PBS سه بار شستشو داده شد.

۷- باکوبیدن پلیت بر روی چند کاغذ حوله‌ای، PBS خارج شد.

۸- مرحله Blocking، ۲۰۰µl از محلول Blocking را به هر چاهک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق شیک گردید.

۹- چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو داده شدند و سپس با کوبیدن پلیت بر روی کاغذ حوله ای PBS خارج شد.

۱۰- آنتی بادی باغلظت ۱/۲۰۰۰ مطابق پروتکل اضافه شد.

۱۱- چاهک‌ها با PBS مطابق دستورالعمل سه بار شستشو داده شدند.

۱۲- مرحله Development، ۱۰۰µl از محلول TMB به هر چاهک اضافه گردیده به طوری که رنگ همه چاهک‌ها آبی شد و سپس ۱۰۰µl اسید فسفریک ۱M برای توقف این مرحله اضافه و در نتیجه رنگ آبی به زرد تغییر پیدا کرد که در طول موج ۴۵۰nm خوانده شد. از جدول سری‌های استاندارد به منظور رسم منحنی استاندارد برای بررسی میزان پروتئین مشخص شده در روش Elisa استفاده شد.

پرایمر random و پرایمرهای اختصاصی 5' S-22mer 3' TTG CCT TTG GTC AGT ATC TTC A و 5' AS-23mer 3' ACA GAG GTT TTT CAC AGC ATT (CC-3') تکثیر یافت.

آنالیز پروتئین با روش وسترن بلات

برای تشخیص آلبومین ۱۶۰µl از ۳ میلی لیتر محیط YPD تلقیح شده برداشته و به ۳ میلی لیتر محیط Derepression تلقیح شد و مایع رویی بعد از ۲ شبانه روز انکوباسیون، بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شد. پروتئین‌ها با استفاده از جریان الکتریسته از روی ژل به غشا PVDF (Polyvinyl De Fluoride) منتقل شدند. این غشا سپس در بافر بلوکه کننده

(pH=7/5، ۰/۰۱ Tween20، ۰/۰۱ NaCl، ۰/۰۱ Tris، ۰/۰۱ mM) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شد.

آنتی بادی‌های متصل شونده در ۶۰ میلی لیتر بافر بلوکه کننده حاوی آنتی بادی خرگوش ضد HSA (۱۲۰µl) فرصت اتصال را یافتند. غشا PVDF سه بار با سالین ۰/۰۱۵٪ حاوی ۵۰mg Tween 20 شستشو شد. سپس در بافر بلوکه کننده حاوی آنتی بادی ضد IgG خرگوشی کونژوگه با پراکسیداز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.

بعد از شستشو، غشا درون یک سوبسترا حاوی w/v ۰/۰۶٪، ۴ کلو-۱ نفتل و ۰/۰۱٪ H₂O₂ به همراه آب مقطر انکوبه شد تا باندهای پروتئین آلبومین رنگ گرفته و مشخص شوند.

آنالیز پروتئین با HPLC

نمونه‌های کشت حاصل از فلاسک در ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و خلوص HSA و ساختار مولکولی آن در مایع رویی با آلبومین استاندارد تجاری توسط سیستم کروماتوگرافی HPLC، KNAUER شامل UV دکتور - injector، پمپ، ستون محافظ، رکوردر و ستون اصلی TSK-gel G3000 SW × L (7.8×300mm, Tosoh, Japan) مقایسه گردید.

در این سیستم از سرعت جریان ۰/۵ml/min و فشار کمتر از ۵ میلی پاسکال، پس از تزریق ۵ میکرولیتر از

نتایج

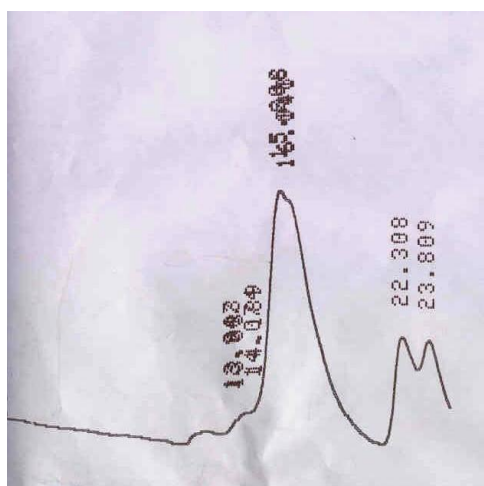
به منظور افزایش بیان HSA، پارامترهای موثر در تولید آلبومین در فلاسک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تولید HSA حاصل از سلول‌هایی که در محیط YNB 1% Glycerol Phosphate buffer رشد کرده‌اند، بیشتر از محصول سلول‌هایی است که در دو محیط کشت دیگر یعنی محیط‌های زیر وجود دارند: YP 1% Glycerol, YNB 1% Glycerol without buffer. محیط‌های کشت حاوی آنتی پروتئاز با تیتراژ ۱/۴۰ نسبت به محیط‌های کشت فاقد آنتی پروتئاز، میزان HSA بیشتری را نشان دادند. از میان سه زمان انکوباسیون یعنی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بیشترین میزان تولید مربوط به زمان ۴۸ ساعت بود. پس از مشخص شدن بهترین شرایط یعنی استفاده از محیط YNB 1% buffered Glycerol حاوی آنتی پروتئاز ۱/۴۰، درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت تولید آلبومین در هانسونلاپلی مورفا، میزان تولید HSA به

۱۷/۶ mg/l رسید.

RT-PCR

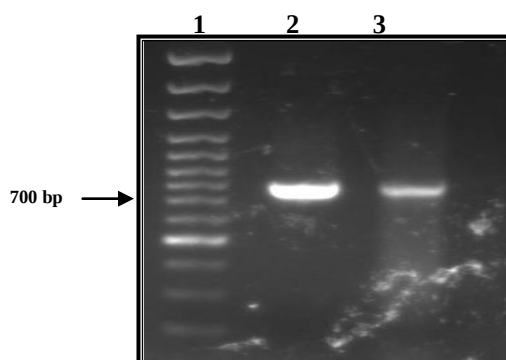
برای مطالعه میزان بیان HSA در سلول‌های ترانسفورم شده، کل میزان mRNA و پروتئین آنالیز شدند. RNA مورد مطالعه در RT-PCR، از سلول‌های کشت داده در محیط YNB 1% Glycerol Phosphate Buffer استخراج شد. و با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و پرایمرهای اختصاصی، قطعه مورد نظر تکثیر شده و محصولات حاصله برای بررسی بر روی ژل آگار برده شد (شکل ۲).

آنالیز وسترن بلات نیز برای تشخیص HSA تولیدی انجام شد. نتیجه وسترن بلات نشان داد که بیشترین میزان HSA ترشحی مربوط به سلول‌هایی است که در محیط YNB 1% Glycerol Phosphate Buffer به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده‌اند (شکل ۳).

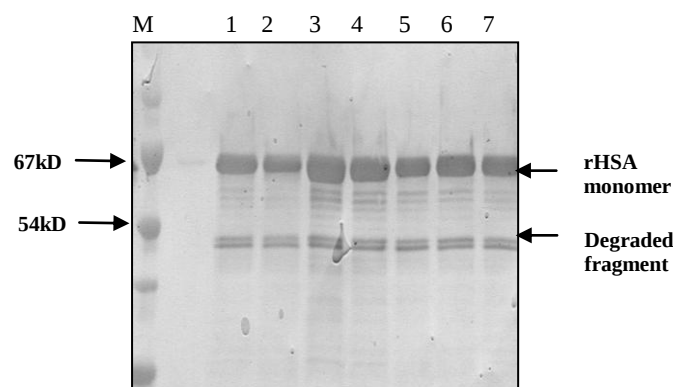


شکل ۴: منحنی به دست آمده مربوط به مخلوطی از پروتئین‌ها از جمله آلبومین می باشد که در زمان ۱۷-۱۵ دقیقه خارج شده و پیک دیگر مربوط به پروتئین‌هایی با وزن ملکولی کمتر از آلبومین است که در زمان‌های ۲۲ الی ۲۳ دقیقه ثبت شده است.

مقایسه دیاگرام مربوط به نمونه مورد نظر با نمونه استاندارد (که دارای پیک تیز و زمان خروج ۱۶ دقیقه مربوط به آلبومین خالص است) نشانی از وجود پروتئینی با وزن ملکولی بسیار نزدیک به آلبومین و همچنین پروتئین‌هایی با وزن ملکولی کمتر از آن می باشد که احتمالاً این پروتئین‌ها با وزن ملکولی کمتر بر اثر تجزیه



شکل ۲: (۱) مارکر ۱۰۰bp (۲) cDNA ساخته شده با استفاده از Random primer (۳) cDNA ساخته شده با استفاده از پرایمر اختصاصی



شکل ۳: نتیجه آزمایش وسترن بلات برای مایع رویی محیط‌های کشت سلول‌های مخمر است. نمونه‌های ۱ تا ۷ مایع رویی حاوی HSA می باشد. (M) مارکر ملکولی پروتئین.

ملکولی آلبومین به وجود آمده اند و باید در مراحل بعدی نسبت به جداسازی آنها اقدام شود (شکل ۴).

بحث

در نتیجه انجام این بررسی، خط تولید آلبومین نو ترکیب در مقیاس آزمایشگاهی راه اندازی شد و عوامل مؤثر بر افزایش بیان آلبومین و در نتیجه افزایش تولید HSA مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش های وسترن بلا تینگ و Elisa حداکثر میزان آلبومین قابل دسترس در این بررسی ۱۷/۶mg/l بود.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که در ایران انجام گردید کاملاً مشابه و قابل مقایسه با نتایج بررسی موازی و مشابهی بوده است که با همکاران دیگر در دانشگاه دوسلدروف انجام شد.

علاوه بر مطالعات اولیه که در مقیاس آزمایشگاهی انجام گرفت، سوش و شرایط تولید به دست آمده در این مطالعات در مقیاس نیمه صنعتی با استفاده از فرماتور در مؤسسه فرانهورف آلمان مورد بررسی قرار گرفت که نتایج گزارش

شده حاکی از دستیابی به ۴۷۸mg/l آلبومین بوده است. در مطالعات مشابهی که در کشورهای کره و ژاپن با استفاده از سوش *H. polymorpha* DH1 انجام گردیده نشان داده شده که در مقیاس آزمایشگاهی این تحقیق، به مقادیر ۲۵-۲۰mg/l دست یافته اند و پس از بهینه سازی شرایط و عوامل مؤثر، تولید آلبومین در مقیاس نیمه صنعتی به ۱۴۰۰-۱۲۰۰mg/l افزایش یافته است (۱۳، ۶). مقایسه این نتایج بیانگر آن است که انجام مطالعات دقیق تر و وسیع تر در مقیاس نیمه صنعتی می تواند در افزایش میزان تولید آلبومین مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله از آقایان دکتر احمد قره باغیان و دکتر کامران موسوی حسینی، خانم ها سودابه بنزاده، صدیقه چابک پی و صدیقه نوروزنیا به خاطر همکاری صمیمانه تشکر می نمایند. متذکر می شود بدوجه این تحقیق توسط سازمان مدیریت و برنامه ریزی کشور و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تأمین گردیده است.

منابع

- 1- Mingetti P. P., Ruffner D.E., Kuang W.J., Dennison. E, Hawkin J.W., Beattie W.G., and Dugaiczy K A.: Molecular structure of human albumin gene is revealed by nucleotide sequence with in q11-22 of chromosome 4. J.Biol.Chem, 1986, 261: 6747-6757.
- 2- He X.M. and Carter D.C.: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature 1992, 358: 209-215.
- 3- Carter D. C., Chang B., Ho J.X., Keeling K., and Krishnassmi Z.: Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. Eur.J.Biochem, 1994, 226: 1049-1052.
- 4- Peters T: Serum albumin, In book: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., and Richrds, F M. Advances in protein chemistry, vol.37, Academic Press Inc., San Diego, 1985: 161-254.
- 5- Peters T: Clinical Aspect In Putnam, F.W: All about albumin. Academic Press, Inc., San Dieogo, 1996: 251-284.
- 6- Kaora K: High level expression of recombinant Human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and Activation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001: 55-61.
- 7- Barr K.A. Hopkins S.A., and Sreekrishna K: Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. Pharmaceutical Engineering, 1992, 12: 48-51.
- 8- G.Gellissne, et al: Heterologouse protein production in metylotrophic yeasts, 2000: 195-249.
- 9- Sunders C.W., Schmidt J., Mallonee R.L, and Guyer M.S: Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol, 1987, 169: 2917-2925.
- 10- Sleep D., Belifield G.P., and Goodey A. R: *Saccharomyce cerevisiae* strains that overexpress hetrologus proteins. Bio/Technology, 1991, 9: 183-187.
- 11- Hodhkins M.A., Sudbery P.E., Kerry-Williams S., and Goody.A: Secretion of human serum albumin from *Hansenula polymorpha*. Yeast, 1990, 68: 435.
- 12- Fleer R., Yeh P., Amellal N., Maury I., Fournier A., Baccheta F., Baduel P., Jung G., L'Hote H., Becquart J., Fukuhara H., and Mayaux J.F: Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. Bio/ Technology, 1991, 9: 968-975.
- 13- Hyun A. K, and Whankoo K: Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in *Hansenula polymorpha* DL-1.

Expression of recombinant human serum albumin in the methylotrophic yeast; *Hansenula polymorpha*

Abbasi Moheb L.¹, Haghighi M.M.¹, Ghamari A.R.¹, Adibi Motlagh B.², Rezvan H.², Piontek M.³, Hellweg S.³, Pourfathollah A.A.^{2,4}, Kahrizi K.¹, Najmabadi H.¹

¹Welfare and Rehabilitation University-Genetics Research Center

²Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

³Duseldorf University, Germany

⁴Tarbiat Modarres University, Tehran

Abstract

Background and Objectives

Human serum albumin (HSA) is the major protein component of human plasma. It plays a very important role in transporting of macro molecules and maintaining the normal osmolarity. It is used as a therapeutical protein in patients with hypoalbuminemia and acute bleeding and burning. Albumin consumption in the world is about 500 ton/year. The aim of this research is to study the production of rHSA in shake flask culture by *Hansenula polymorpha*.

Materials and Methods

H. polymorpha was used for the production of recombinant human serum albumin (rHSA) in several of shake flask culturing; expression of rHSA was investigated relating several parameters affecting the expression of HSA. To optimize the secretory expression of rHSA under the control of FMD promoter in *H. polymorpha* RB-11 incubation time, culture media temperature and protease inhibitors were analyzed.

Results

This study not only established production of rHSA in yeast but also analyzed the correlation between affecting parameters and the level of HSA expression. Comparison of the HSA levels in the culture supernatants showed that the highest HSA yield was 17.6mg/l. The research shows that among three different temperatures (25°C, 30°C and 37°C) 37°C was the best temperature and amongst three different incubation times (24h, 48h and 72h) 48h was the optimum time and YNB 1% glycerol with buffer was the best derepression medium in comparison with others.

Conclusions

Using these optimized conditions, stable production of rHSA of around 17.6mg/l was achieved. Our results suggest that affecting expression factors improved in this study are suitable for production of recombinant albumin.

Key words: *Hansenula polymorpha*, Yeast, Human serum albumin, Affecting factors