خون
فصلنامه پژوهشی
زمستان ۸۳ سال ۱ شماره ۲

تولید آلبومین سرم انسانی نوترکیب در مخمر متیلوتروف هانسونلا پلی مورفا

لیا عباسی محب[۱]، مهدی منتظر حقیقی[۲]، علیرضا قمری[۲]، بهزاد ادیبی‌مطلق[۳]، دکترحوری رضوان[۴]، دکترمایکل پوینتک[۵]
دکتراستفان هل وگ[۵]، دکترعلی اکبر پور فتح‌الله[۶]، دکترکیمیا کهریزی[۷]، دکترحسین نجم آبادی[۸]

چکیده

سابقه و هدف

آلبومین عمده‌ترین پروتئین پلاسما می‌باشد. این پروتئین نه تنها به عنوان حامل بسیاری از ماکروملکول‌ها در بدن نقش عمده‌ای ایفا می‌کند بلکه نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی دارد. امروزه از آلبومین در درمان خونریزی‌ها و سوختگی‌های شدید و هم‌چنین در درمان افراد مبتلا به کمبود آلبومین استفاده می‌شود. مصرف سالیانه آلبومین در دنیا حدود ۴۵۰ تن می‌باشد. به‌منظور برطرف کردن این نیاز و تولید آلبومین عاری از هرگونه آلودگی از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده گردیده است.

در این تحقیق از مخمر هانسونلا پلی مورفا که امروزه در سطح وسیعی به منظور تولید پروتئین‌های هترولوگ به‌کار برده می‌شود، برای آلبومین انسانی نوترکیب استفاده گردیده است.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی (experimental) است. به‌منظور تولید پروتئین آلبومین نوترکیب و هم‌چنین 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 مهارکننده‌های پروتئازی بیان آلبومین مورد بررسی قرار گرفت. آلبومین تولید شده با روش‌هایی هم‌چون الایزا، HPLC و Western Blot ارزیابی شد.

یافته‌ها

درطی این تحقیق چهارعامل مهم دربیان پروتئین آلبومین موردمطالعه قرارگرفت ومشخص 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 ۳۰،۲۵ و۳۷ 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 به‌دست آمد.

نتیجه گیری

بالاترین میزان تولید شده تحت شرایط بهینه به‌دست آمده در مقیاس آزمایشگاهی، ۱۷/۶mg/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 نشان‌دهنده آن است که می‌توان تولید پروتئین آلبومین را در شرایط انبوه ادامه داد.

کلمات کلیدی: آلبومین سرم انسانی، مخمر هانسونلاپلی 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

مقدمه

آلبومین سرم انسانی اصلی‌ترین ترکیب پروتئین پلاسمای انسان است. این پروتئین ازیک زنجیره پلی پپتیدی ۵۸۵ اسیدآمینه‌ای فاقد قند به وزن ملکولی۶۶/۵KD تشکیل شده است (۱).

این ملکول قطبی بوده ودارای سه ناحیه است(۲). میزان آلبومین در پلاسما ۴۲±۳/۵g/l می‌باشد. HSA[1] در کبد تولید شده و مسؤول نگهداری فشار اسمزی خون است. آلبومین همچنین به‌عنوان یک ناقل برای بسیاری از ملکول‌های کوچک عمل کرده و از نظر کلینیکی، برای درمان هیپوآلبومینمی در شوک‌های حاصل از ضربه استفاده می شود (۵، ۳،۴).

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

بنابراین با توجه به این محدودیت ها و به منظورامکان دستیابی به مقادیر بیشتر و هزینه کمتر، دستیابی به یک روش جایگزین صنعتی و بی‌خطر برای تولید آلبومین، موردنظرمحققان اکثرکشورهای دنیا ازجمله ایران قرار گرفته‌است تا نه‌تنها بتوان نیاز داخلی را به این محصول پرمصرف برطرف کرد بلکه زمینه صادرات آن نیز فراهم شود.

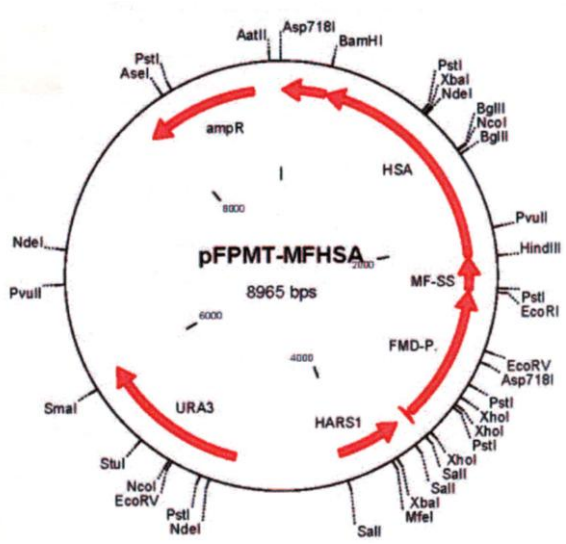
مصرف سالیانه آلبومین دردنیا۴۵۰ تن است که می‌تواند یک تضمین خوب برای بازار مصرف محصول باشد. به‌منظور بر طرف کردن این نیاز و تولید آلبومین عاری از هرگونه آلودگی، از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده گردیده است (۷).

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

مواد و روش‌ها

مشخصات سوش و پلاسمید

مخمر استفاده شده در این مطالعه، هانسونلا پلی مورفا RB-۱۱ اگزوتروفیک به یوراسیل بود که از سوش وحشی ATCC35438 به‌دست آمده است (۸). پلاسمید pFPMTMFαHSA 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[2] و مارکرهای انتخابی URA3 و amp^R است که از پلاسمید pFPMT121 مشتق شده است (شکل ۱).



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

1- Human Serum Albumin
2- Hansenula Autonomus Replication Sequence

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

ترانسفورماسیون هانسونلاپلی مورفا و غربال سلول‌های ترانسفورم شدهٔ 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 حدود۸۰ بارطی مراحل متناوب کشت بدون تغییر شرایط تکثیریافتند. پلاسمیدها به‌صورت ردیفی (سر به انتها) درون ژنوم مخمرالحاق شدند. به‌منظور 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 قرارگرفت. 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 ازپلیت Stock حاوی مخمربرداشته شد ودرون۳ میلی‌لیترمحیط YPD مایع کشت داده شد. این محیط‌ها در سه دمای مختلف ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 موج۶۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر(Eppendorf مدل Biophotometr) مشخص شد(OD=1 معادل ۰/۳g/l وزن خالص سلول‌های هانسونلا پلی مورفا است). به‌منظور جداسازی سلول‌ها، محیط‌های حاوی سلول‌های مخمر با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (HERMLE مدل Z ۳۲۰) شدند و سپس رسوب سلولی با آب مقطر استریل مخلوط شد. از این سوسپانسیون سلولی به منظور تلقیح ۳ فلاسک۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های ذکر شده استفاده شد. این فلاسک‌ها به‌طور جداگانه در سه دمای مختلف ۳۰،۲۵ و۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکر دار انکوبه شدند (۱۱).

متغیر دما

به علت سازگاری هانسونلا پلی مورفا با دامنه وسیعی از دما یعنی از ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد، سه دمای مختلف انکوباسیون (۲۵، ۳۰ و۳۷ درجه سانتی‌گراد) را هم به‌صورت مجزا و هم در رابطه با دیگر پارامترها مورد مطالعه قرار گرفت(۱۲).

متغیر آنتی پروتئاز

مخلوط آنتی پروتئازی حاوی Pepestatin 1M، PMSF 200µM، Leupeptin 1µM محلول در EDTA 100µM با تیترهای 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 و۳۷ درجه سانتی‌گراد غلظت HSA موردارزیابی قرار گرفت (تمام آنتی پروتئازها از شرکت DAKO خریداری شده بود) (۷).

زمان انکوباسیون

سه زمان انکوباسیون مختلف۴۸،۲۴و۷۲ ساعت به‌منظور دستیابی به بالاترین میزان HSA ترشحی بررسی شد.

آنالیز RNA با استفاده از RT-PCR

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

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

آنالیز پروتئین با روش وسترن بلات

برای تشخیص آلبومین ۱۶۰µl از ۳ میلی‌لیترمحیط YPD تلقیح شده برداشته و به۳ میلی‌لیترمحیط Derepression تلقیح شد و مایع رویی بعد از۲ شبانه روز انکوباسیون، برروی ژل SDS-PAGE بررسی شد. پروتئین‌ها با استفاده از جریان الکتریسیته از روی ژل به غشا PVDF (Polyvinyl De Fluoride) منتقل شدند. این غشا سپس در بافر بلوکه کننده (۱۰۰mM Tris، ٪۰/۹Nacl، ٪۰/۱ Tween20، pH =۷/۵) به مدت یک ساعت در دمای اتاق تیمار شد.

آنتی بادی های متصل شونده در ۶۰ میلی‌لیتر بافر بلوکه کننده حاوی آنتی‌بادی خرگوش ضد HSA (۱۲۰µl) فرصت اتصال را یافتند. غشا PVDF سه‌بار با سالین ٪۰/۸۵ 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 (٪۰/۰۶ w/v، ۴ کلرو-۱ نفتل و H_2O_2 ٪۰/۰۱) به همراه آب مقطر انکوبه شد تا باندهای پروتئین آلبومین رنگ گرفته و مشخص شوند.

آنالیز پروتئین با HPLC

نمونه‌های کشت حاصل ازفلاسک در۷۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت 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 دتکتور- 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 نمونه و عبور محلول شستشو (بافر فسفات pH=۶/۷ ۰/۱M) استفاده شد.

جذب نوری پروتئین‌های موجود در نمونه در ۲۸۰nm اندازه گیری و منحنی مربوطه رسم شد.

اندازه‌گیری آلبومین با روش Elisa

۱- لوله‌های حاوی محیط های کشت و سلول‌های مخمر به مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور جداکردن 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- مرحلهCoating، 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 چاهک ها با PBS ۲۰۰µl سه بار شستشو داده شد.

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

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

۹- چاهک ها 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.

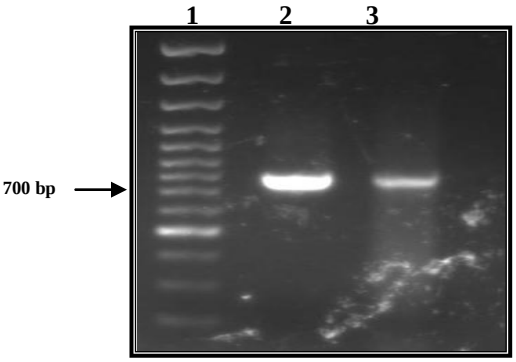
۱۱- چاهک‌ها با PBS مطابق دستورالعمل سه بار شستشو داده شدند.

۱۲- مرحله Development، ۱۰۰µl از محلول TMB به هر چاهک اضافه گردیده به‌طوری که رنگ همه چاهک ها 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.

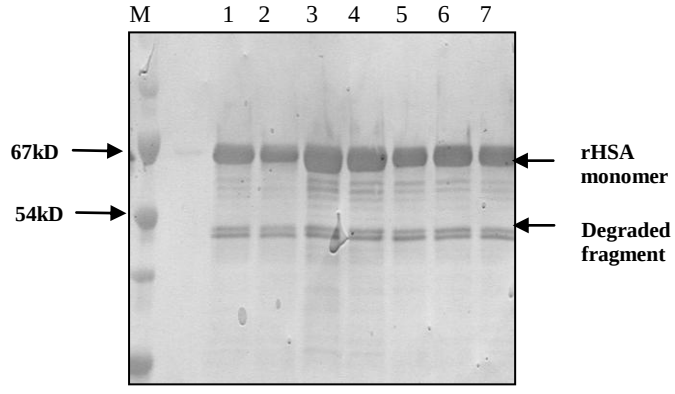
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

نتایج

به منظور افزایش بیان HSA، پارامترهای موثر در تولید آلبومین در فلاسک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تولیدHSA حاصل از سلول‌هایی که در محیط YNB 1% Glycerol Phosphate buffer رشد کرده‌اند، بیشتر از محصول سلول هایی است که در دو محیط کشت دیگر یعنی محیط های زیر وجود دارند:
YP 1% Glycerol, YNB 1% Glycerol without buffer
محیط‌های کشت حاوی آنتی پروتئاز با تیتر 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، در۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت تولید آلبومین در هانسونلاپلی مورفا، میزان تولید HSA به ۱۷/۶ mg/l رسید.



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



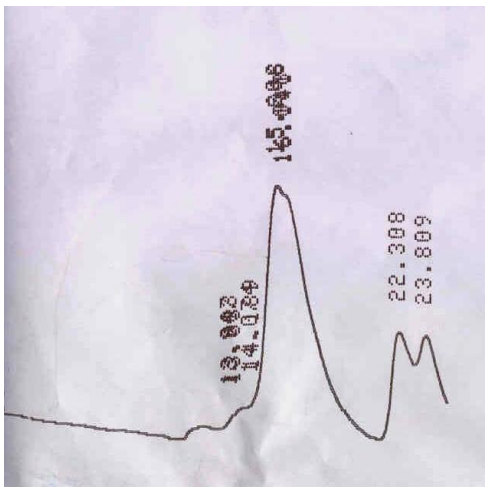
شکل ۳: نتیجه آزمایش وسترن بلات برای مایع رویی محیط‌های کشت سلول‌های مخمر است. نمونه های ۱ تا ۷ مایع رویی حاوی HSA می باشد.
M) مارکر ملکولی پروتئین.

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 Hexsamer 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 به‌مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده‌اند (شکل۳).



شکل ۴ : منحنی به‌دست آمده مربوط به مخلوطی از پروتئین ها از جمله آلبومین می باشد که در زمان ۱۷-۱۵ دقیقه خارج شده و پیک دیگر مربوط به پروتئین هایی 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 پروتئین هایی با وزن ملکولی کمتر از آن می باشد که احتمالاً این پروتئین‌ها با وزن ملکولی کمتر بر اثر تجزیه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

ملکولی آلبومین به وجود آمده اند و باید در مراحل بعدی نسبت به جداسازی آنها اقدام شود (شکل۴).

بحث

در نتیجه انجام این بررسی، خط تولید آلبومین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی راه‌اندازی شد و عوامل مؤثر بر افزایش بیان آلبومین و در نتیجه افزایش تولید HSA مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش‌های وسترن بلاتینگ و Elisa حداکثر میزان آلبومین قابل دسترس در این بررسی ۱۷/۶mg/l بود .

نتایج به‌دست 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 برمطالعات اولیه که در مقیاس آزمایشگاهی انجام گرفت، سوش و شرایط تولید به‌دست‌آمده در این مطالعات در مقیاس نیمه صنعتی با استفاده از فرمانتور در مؤسسه فرانهوفر 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 ۲۰-۲۵mg/l دست‌یافته‌اند و پس از بهینه‌سازی شرایط و عوامل مؤثر، تولید آلبومین در مقیاس نیمه صنعتی به ۱۲۰۰-۱۴۰۰mg/l افزایش یافته است (۱۳، ۶). مقایسه این نتایج بیانگر آن است که انجام مطالعات دقیق تر و وسیع‌تر در مقیاس نیمه صنعتی می‌تواند در افزایش میزان تولید آلبومین مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله از آقایان دکتر احمد قره‌باغیان و دکتر کامران موسوی حسینی، خانم‌ها سودابه بنازاده، صدیقه چابک‌پی و صدیقه نوروزنیا به خاطر همکاری صمیمانه تشکرمی‌نمایند. متذکر می‌شودبودجه این تحقیق توسط سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی 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 PressInc.,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*: Heterologuse protein production in metylottophic 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]

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]

[1]*Welfare and Rehabilitation University-Genetics Research Center*
[2]*Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[3]*Duseldorf University, Germany*
[4]*Tarbiat 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 experssion factors improved in this study are suitable for production of recombinant albumin.

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

Correspondence: Abbasi Moheb L., M.S., Genetics Research Center of Welfare and Rehabilitation University
Tel: (+9821) 2402070; Fax: (+9821) 2402070
E-mail: *l.abbasi@uswr.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-03]