خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۱ (۳۱۲-۳۰۱)

مقاله پژوهشی

کلونینگ آنزیم آلفا گالاکتوزیداز با هدف تبدیل آنتی‌ژن B گروه خونی به آنتی‌ژن O

افسانه حداد دیلمی[۱]، میترا صالحی[۲]، مجید شهابی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

کمبود گروه‌های خونی سیستم ABO یکی از مشکلات متداول مراکز انتقال خون در دنیا می‌باشد. هم زمان با پیشرفت علم مهندسی ژنتیک و تخلیص پروتئین‌ها، تبدیل آنتی‌ژن‌های A و B به آنتی‌ژن O و ایجاد گروه خونی واحد مطرح شد. هدف از این پژوهش، بیان ژن آلفا گالاکتوزیداز در میزبان پروکاریوتی *E.coli* با ایجاد تغییرات پس از ترجمه و در نهایت تبدیل آنتی‌ژن B گروه خونی به آنتی‌ژن O بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ژن آلفا گالاکتوزیداز دانه قهوه که پس از بهینه‌سازی کدون‌ها در پلاسمید pBHA حاوی جایگاه برش آنزیم‌های BamH1 و Nco1 کلون شده بود، در باکتری *E.coli* سویه TOP10 تکثیر و استخراج شد. ژن آلفا گالاکتوزیداز پس از برش با آنزیم‌های فوق و تخلیص روی ژل آگاروز مجدداً در پلاسمید بیانی pET-20b کلون شده و به باکتری *E.coli* سویه rosetta 2 (DE3) وارد شد. بیان ژن با استفاده از القاکننده IPTG انجام شد. وجود پروتئین تولیدی با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. آزمون عملکرد پروتئین نیز با توانایی تبدیل گلبول‌های B به O ارزیابی شد.

یافته‌ها

وسترن بلات و SDS-PAGE وجود پروتئین در پری پلاسم باکتری را تائید کرد. آنزیم تخلیص شده توانست آنتی‌ژن B را به طور نسبی از گلبول قرمز حذف کرده و میزان آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم B را به میزان زیادی کاهش دهد.

نتیجه گیری

بیان پروتئین یوکاریوتی در میزبان پروکاریوتی می‌تواند در تولید انبوه آنزیم گالاکتوزیداز برای کاربرد در مراکز انتقال خون کارگشا باشد. بهینه‌سازی شرایط مختلف بیان برای دستیابی به مقادیر کافی از آنزیم ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: گروه خونی، گالاکتوزیداز، *E.coli*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی ـ دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: دکترای تخصصی بیولوژی سلولی و مولکولی با گرایش باکتریولوژی مولکولی ـ استادیار دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ـ تهران ـ ایران ـ کد پستی: ۱۶۵۱۱۵۳۵۱۱
۳- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

مقدمه

سیستم گروه خونی ABO مهم‌ترین سیستم گروه خونی در طب انتقال خون می‌باشد. پایه آنتی‌ژن‌های این سیستم ماده H می‌باشد که در سطح تمام گلبول‌های قرمز وجود دارد. جایگاه ژنی ABO داری سه آلل A ، B و O می‌باشد(۱).

آلل‌های A و B آنزیم‌های ترانسفرازی را کد می‌کنند که باعث اتصال واحدهای کربوهیدراتی به ماده H می‌شوند. محصول پروتئینی آلل A آنزیم ان استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز است که یک مولکول ان استیل گالاکتوزآمین را به ماده H متصل می‌کند و آنتی‌ژن A را به وجود می آورد. آلل B آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز را کد می‌کند که با افزودن یک مولکول گالاکتوز به ماده H آن را تبدیل به آنتی‌ژن B می‌کند. آلل O فاقد محصول خاصی بوده و افراد هموزیگوت برای این آلل، ماده H را به صورت دست نخورده در سطح گلبول‌های قرمز خود بیان می‌کنند.

به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های ABO در همه افراد، بدون مواجهه قبلی با گلبول‌های قرمز انسانی، گروه‌بندی صحیح اهداکننده و دریافت‌کننده خون از نظر ABO ، اساس ایمنی انتقال خون را تشکیل می‌دهد. تزریق خون ناسازگار از نظر ABO به بیمار می‌تواند منجر به همولیز داخل عروقی و عوارض جدی ناشی از واکنش انتقال خون حاد شود(۳، ۲).

در بین گروه‌های خونی، گروه O به عنوان دهنده همگانی برای بسیاری از بیماران به ویژه در موارد اورژانسی که امکان تعیین گروه ABO میسر نیست مورد استفاده قرار می‌گیرد(۴). بررسی فراوانی گروه‌های ABO در جمعیت ایرانی نشان داده که گروه O و A بیشترین درصد جمعیت را تشکیل می‌دهند(به ترتیب ۳۶/۴۹ و ۳۲/۰۹ درصد). به دنبال آن‌ها گروه B با فراوانی ۲۳/۶۸٪ و گروه AB با فراوانی ۷/۷۴٪ قرار دارند(۵).

اندیشه تبدیل همه گروه‌های سیستم ABO به گروه O از ابتدای دهه ۱۹۹۰میلادی مطرح شد. در بین گروه‌های خونی، آنتی‌ژن B فقط در گالاکتوز انتهایی با آنتی‌ژن O متفاوت است. بنابراین با استفاده از آنزیم گالاکتوزیداز (α-galactosidas)، می‌توان گروه B را به O تبدیل کرد(۸-۶). از آن جا که ناخالصی‌های همراه با آنزیم استخراج شده از منابع گیاهی می‌توانست منجر به بروز عوارض و واکنش‌های ناخواسته شود. از این رو تکنولوژی DNA نوترکیب مورد استفاده گرفت. استفاده از این تکنولوژی، امکان تولید آنزیم را در مقیاس وسیع و با آلودگی کمتر امکان‌پذیر ساخته است. به علاوه، مشخص شده که نوع نوترکیب در مقایسه با آلفاگالاکتوزیداز استخراج شده از منابع گیاهی(دانه سبز قهوه) بسیار کارآمدتر است(۱۰، ۹).

در صورتی که امکان تبدیل خون افراد گروه B به گروه O میسر شود، گام مهمی در جهت فراهم آوردن ذخیره خونی می‌باشد. یکی از مشکلات در این زمینه تولید انبوه آنزیم آلفاگالاکتوزیداز با کارآیی مناسب و در مقیاس وسیع است.

لذا مطالعه حاضر، با هدف تولید آنزیم بهینه‌سازی شده آلفا گالاکتوزیداز و کلونینگ آن در باکتری *E.coli* انجام می‌گیرد. از باکتری *E.coli* به دلیل دارا بودن خصوصیاتی مانند سهولت دستکاری ژنتیکی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

۱- بهینه‌سازی و ساخت ژن:

در یک مطالعه تجربی، توالی ژن گالاکتوزیداز مربوط به قهوه سبز از پایگاه داده NCBI تهیه شد. این توالی توسط شرکت بیونیر پس از بهینه‌سازی از نظر کدون‌ها(codon optimization) ساخت و در وکتور pBHA کلون شد. به علاوه جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده Nco1 و BamH1 جهت قرارگیری ژن در وکتور نیز به آن اضافه شد که از این جایگاه‌ها برای برش و خارج کردن ژن از وکتور در مراحل بعدی استفاده می‌شود. ژن ساخته شده با غلظت ۵ µg و به صورت لیوفلیزه دریافت شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

۲- *آماده‌سازی سلول‌های مستعد:*

جهت آماده‌سازی سلول‌های مستعد، باکتری *E.coli* سویه TOP10 در محیط LB Agar فاقد آمپی‌سیلین کشت داده شد. سایر مراحل به طور خلاصه عبارت بود از: انتخاب یک کلون پس از ۲۰ ساعت نگهداری در انکوباتور و تلقیح به ۵ mL محیط LB Broth بدون آمپی‌سیلین و کشت آن به مدت یک شب. باکتری کشت شده به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد تا رشد باکتری متوقف شود. سپس به فالکون سرد منتقل و در ۸۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و محیط رویی دور ریخته شد. رسوب باکتری در محلول استریل ۰/۱ مولار $CaCl_2$ سرد سوسپانسیون شد.

۳- *ترانسفورماسیون به سلول‌های مستعد TOP10:*

یک میکروتیوب حاوی ۵۰ µL از سلول‌های مستعد TOP10 روی یخ قرار داده شد و مقدار ۲ µL از پلاسمید pBHA حاوی ژن گالاکتوزیداز ساخته شده با غلظت ۰/۵ µg/µL به میکروتیوب حاوی ۵۰ µL سلول‌های مستعد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. مخلوط حاصل به مدت ۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس فوراً به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از این مرحله ۱۵۰ µL محیط کشت LB Broth فاقد آمپی‌سیلین به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مخلوط حاصل به پلیت LB Agar حاوی ۱۰۰ µg/mL آمپی‌سیلین منتقل، روی سطح آگار گسترده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. چند کلنی انتخاب شد و وجود ژن مورد نظر در آن‌ها با روش PCR colony و با آغازگرهای اختصاصی وکتور تائید شد(جدول ۱).

۴- تکثیر پلاسمید:

پس از رشد کلنی‌های حاوی پلاسمید pBHA، یک تک کلون از پلیت انتخاب کرده به ۲۰ mL محیط LB broth حاوی آمپی‌سیلین(۱۰۰µg/mL) منتقل گردید. محیط فوق به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شیکر ۲۵۰ rpm انکوبه شد.

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت DENAzist plasmid isolation kit انجام شد.

جدول ۱: بررسی ژن آلفاگالاکتوزیداز با روش colony PCR و با آغازگرهای اختصاصی وکتور

توالی آغازگرها	pBA_F	5'-ATTGTCTCATGAGCGGATAC-3'	
	pBH_R	5'-GCGTTATCCCCTGATTCTGT-3'	
چرخه دمایی PCR	۱ چرخه	۳۰۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
	۳۵ چرخه	۴۵ ثانیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
		۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتی‌گراد
		۷۵ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
	۱ چرخه	۳۰۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
مواد مورد نیاز برای واکنش PCR	PCR master mix		۱۰ میکرولیتر
	Forward primer (۱۰ µM)		۰/۴ میکرولیتر
	Reverse primer (۱۰ µM)		۰/۴ میکرولیتر
	Template DNA*		۴
	H_2O		۵/۲

*یک کلنی در ۳۰ µL آب بدون نوکلئاز حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفوژ ۴ µL از سوپرناتنت به عنوان template DNA استفاده شد.

۵- *ساب کلون ژن آلفاگالاکتوزیداز در پلاسمید pET-20b:*

برای بیان ژن آلفا گالاکتوزیداز در *E.coli*، قطعه ژنی مورد نظر از پلاسمید pBHA جداسازی و در پلاسمید بیانی pET-20b ساب کلون شد. برای این منظور، پلاسمید بیانی pET-20b و pBHA حاوی ژن آلفاگالاکتوزیداز در میکروتیوب‌های جداگانه با آنزیم‌های BamH1 و Nco1 برش خوردند. واکنش هضم آنزیمی پس از ۱۵ min انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غیرفعال کردن آنزیم‌ها به مدت ۱۵ min در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد(جدول ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

۶- الکتروفورز قطعات و استخراج از ژل:

جهت جداسازی قطعات حاصل از هضم دو گانه آنزیمی از الکتروفورز قطعات در ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. قطعه مورد نظر bp ۱۴۷۵ می‌باشد. قطعاتی از ژل که حاوی باند مورد نظر بودند در زیر UV برش خوردند و به میکروتیوب استریل mL ۱/۵ منتقل شدند. جهت استخراج از ژل از کیت Favor Prep GEL/PCR Purification Kit استفاده شد. پلاسمید بیانی pET-20b با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده فوق برش داده شد. بعد از اطمینان از خطی شدن پلاسمید با استفاده از ژل آگارز، پلاسمید برش خورده و به منظور جلوگیری از اتصال مجدد دو انتهای آن با آنزیم آلکالین فسفاتاز در انتهای ۵ دفسفریله گردید و سپس از روی ژل استخراج و با نانودراپ تعیین غلظت شد.

۷- لیگاسیون ژن آلفا گالاکتوزیداز در پلاسمید pET-20b:

جهت انجام واکنش لیگاسیون، قطعه ژنی و پلاسمید به نسبت ۳ به ۱ وهمراه آنزیم T4 DNA Ligase با هم ترکیب و به مدت یک شب در دمای محیط نگهداری شد(جدول ۳).

۸- انتقال پلاسمید به باکتری:

سلول‌های باکتری *TOP10* ترانسفورمه شده روی محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد داده شدند.

جدول ۲: مواد مورد نیاز برای ساب کلون ژن آلفاگالاکتوزیداز در پلاسمید pET-20b

مواد	مقدار
Sterile DW	۱۰ µL
BamH1 10 U/µL	۱ µL
Nco1 10 U/µL	۱ µL
Buffer r3.1	۴ µL
DNA(pBHA, pET-20b)	۴ µL
final volume	۲۰ µL

جدول ۳: مواد مورد نیاز جهت لیگاسیون ژن آلفا گالاکتوزیداز در پلاسمید pET-20

مواد	مقدار
Sterile DW	۳/۵ µL
10X T4 Ligase Buffer	۲ µL
Insert DNA	۳ µL
pET-20b	۱ µL
T4 DNA Ligase 5u/µL	۰/۵ µL
final volume	۱۰ µL

۹- غربالگری کلون‌های حاوی ژن به روش Colony PCR:

جهت تایید قرار گرفتن ژن آلفاگالاکتوزیداز در پلاسمید از روش Colony PCR استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR از آغازگرهای T7Pro-F و T7ter-R و Ampliqon master mix استفاده شد. در صورتی که عمل لایگیشن و ورود قطعات به داخل پلاسمید به نحو درستی انجام شده باشد، طول قطعه حاصل از Colony PCR، bp ۱۴۷۵ خواهد بود. محصول PCR جهت تعیین توالی ارسال شد. جزئیات برنامه PCR در جدول ۴ آورده شده است.

۱۰- تکثیر و جداسازی پلاسمید:

از میان کلنی‌هایی که وجود ژن در آن‌ها با تعیین توالی تائید شده بود، تعدادی انتخاب و برای تکثیر و استخراج پلاسمید، مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید تکثیر شده در باکتری با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل استخراج گردید. پلاسمیدهای استخراج شده پس از تایید انجام شدن کلون توسط دستگاه نانو دراپ تعیین غلظت و بیشترین غلظت از بین نمونه‌ها جهت انجام واکنش ترانسفورمیشن انتخاب گردید.

۱۱- آماده‌سازی سلول‌های E.coli سویه rosetta 2 (DE3) جهت ترانسفورمیشن:

پلاسمید pET-20b حاوی ژن گالاکتوزیداز با روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* سویه rosetta 2 (DE3) شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

جدول ۴: غربالگری کلون‌های حاوی ژن به روش Colony PCR

توالی آغازگرها	T7pro-R: 5-´TAATACGACTCACTATAGGG-3´	
	T7ter-R: 5´-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3´	
چرخه دمایی PCR	۱ چرخه	۱۸۰ ثانیه — ۹۴ درجه سانتی‌گراد
	۳۵ چرخه	۴۵ ثانیه — ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه — ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۷۵ ثانیه — ۷۲ درجه سانتی‌گراد
	۱ چرخه	۳۰۰ ثانیه — ۷۲ درجه سانتی‌گراد
مواد مورد نیاز برای واکنش PCR	PCR master mix	۱۰ میکرولیتر
	Forward primer (۱۰ µM)	۰/۴ میکرولیتر
	Reverse primer (۱۰ µM)	۰/۴ میکرولیتر
	Template DNA*	۴
	H2O	۵/۲

*یک کلنی در ۳۰ µL آب بدون نوکلئاز حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفوژ ۴ µL از سوپرناتنت به عنوان template DNA استفاده شد.

باکتری ترانسفورم شده روی محیط LB آگار، حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین(۵۰ µg/mL) کشت داده شد و به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس چهار کلنی انتخاب و روی محیط مایع LB حاوی آمپی‌سیلین به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از کشت فوق با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه حاوی آنتی‌بیوتیک مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا جذب نوری محیط(OD600) به محدوده ۱-۰/۶ برسد. در این مرحله محلول IPTG با غلظت ۰/۱ مولار اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انکوبه شد.

۱۲- خالص‌سازی آنزیم ترشحی در محیط کشت:

محیط کشت در دور ۱۴۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت باکتریایی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول PBS سوسپانسیون شد. جدار باکتری‌ها با امواج اولتراسوند (sonication) روی یخ پاره شد. سپس محلول به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۰۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. هر دو جزء حاصل (سوپرناتنت و پلیت) با SDS-PAGE با غلظت ۱۵٪ الکتروفورز شده و با رنگ کومازین‌بلو رنگ‌آمیزی و بررسی شدند. با توجه به وجود پروتئین نوترکیب در پری‌پلاسم، و نیز دارا بودن توالی His-tag در پروتئین، سوپرناتنت حاصل از لیز باکتری‌ها با کمک ستون تمایلی نیکل(Ni-NTA) تخلیص صورت گرفت. برای اطمینان از تخلیص پروتئین مورد نظر پروتئین تخلیص شده ابتدا با SDS-PAGE الکتروفورز شده و با آنتی‌بادی ضد His tag وسترن بلات انجام شد.

۱۳- وسترن بلات:

به منظور تایید نهایی نمونه‌هایی که SDS-PAGE در آن‌ها دارای باند مورد نظر می‌باشد، وسترن بلات انجام شد. پس از الکتروفورز پروتئین‌ها، انتقال باندهای پروتئین جدا شده از ژل پلی‌آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز به وسیله جریان الکتریسیته(mA ۳۰۰ به مدت ۶۰) دقیقه انجام شد. کاغذ به مدت ۱۸۰ دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول بلاکر در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس کاغذ از بلاکر خارج و ۳ بار با بافر TBS-T شستشو داده شد. آنتی‌بادی اولیه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

(mouse anti-histag) با محلول بلاکر به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق و به کاغذ نیتروسلولز اضافه شد و به صورت شبانه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کاغذ از محلول خارج و سه بار با TBS-T شستشو داده شد. در مرحله بعد کاغذ با آنتی بادی ثانویه (Anti-mouse IgG-HRP) به مدت ۹۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کاغذ از محلول خارج و سه بار با TBS-T شستشو داده شد و سپس با محلول ECL (Enhanced chemiluminescence) به مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید. کاغذ در تاریکی نگه داشته شد و با دستگاه کمی لومینسنس بررسی شد.

۱۴- تخلیص آنزیم:

به دلیل وجود توالی His tag تخلیص با کمک ستون تمایلی نیکل Ni-NTA صورت گرفت.

۱۵- آزمایش اولیه فعالیت آنزیم:

به منظور سنجش فعالیت آنزیم، آزمون اولیه تاثیر آنزیم بر گلبول قرمز انجام شد. بدین منظور از گلبول‌های گروه B سوسپانسیون ۵٪ در سالین تهیه شد. میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز ٪۵ در سالین با مقادیر متفاوت از آنزیم تخلیص شده (۱۰۰۰ µL و ۷۵۰ ، ۵۰۰ ، ۲۵۰) در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت مجاور گردید. سپس به گلبول‌ها آنتی‌سرم B اضافه و سانتریفوژ شد. آزمون کراس‌مچ نیز با استفاده از این گلبول‌ها و سرم افراد با گروه‌های مختلف انجام شد.

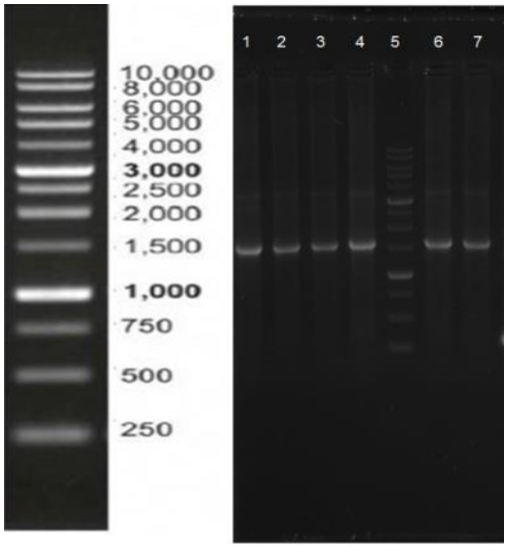
یافته‌ها

نتیجه clony PCR :

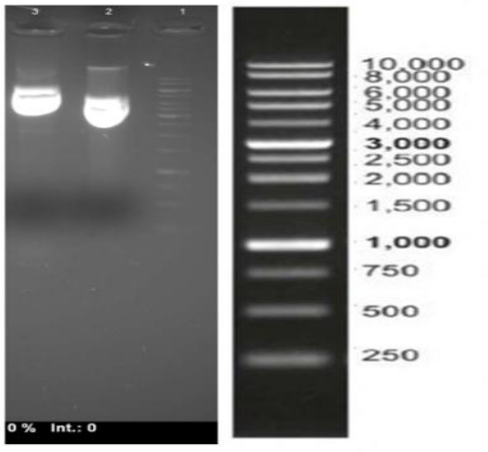
پس از ترانسفورم کردن باکتری TOP10 با پلاسمید pBHA حاوی ژن گالاکتوزیداز و کشت باکتری به صورت شبانه، colony PCR انجام شد (شکل ۱).

استخراج پلاسمید:

پس از تایید حضور ژن *GAL* در پلاسمیدهای pBHA و در مراحل بعد در pET-20b حاصل از لیگاسیون، از آن‌ها برای تکثیر و استخراج پلاسمید استفاده شد. شکل ۲ نشان‌دهنده الکتروفورز این پلاسمیدها روی آگاروز ۱٪ می‌باشد.



شکل ۱: نتیجه clony PCR با آغازگرهای pBA_F و pBH_R. شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ کلنی‌های انتخاب شده و شماره ۵ مارکر DNA هستند.

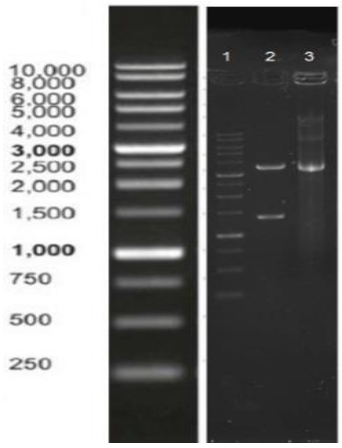


شکل ۲: استخراج پلاسمید. شماره ۱ مارکر DNA ، شماره ۲ پلاسمید pBHA-GAL و شماره ۳ پلاسمید pET-20b-GAL

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

تایید پلاسمید با هضم دوگانه آنزیمی:

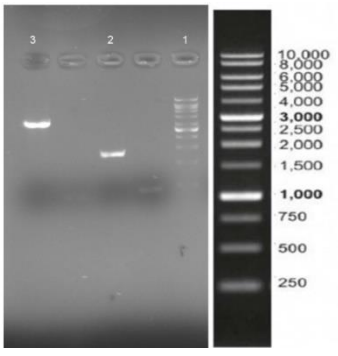
پس از استخراج پلاسمید برای تایید نهایی و قبل از ترانسفورمه کردن باکتری rosetta 2 ، پلاسمید استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های BamH1 و Nco1 هضم آنزیمی گردید. الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی در شکل نشان داده شده است(شکل ۳).



شکل ۳: هضم دوگانه آنزیمی پلاسمید استخراج شده pET-20b-GAL را نشان می‌دهد. شماره ۱ مارکر DNA ، شماره ۲ پلاسمید هضم شده با آنزیم‌های BamH1 و Nco1 و شماره ۳ پلاسمید هضم نشده.

استخراج از ژل:

قطعات حاصل از هضم دوگانه آنزیمی پلاسمید pET-20b پس از استخراج از ژل بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا صحت استخراج از ژل و غلظت باندهای حاصل بررسی شود (شکل ۴).



شکل۴ : الکتروفورز قطعات استخراج شده از ژل. شماره ۱ مارکر DNA، شماره ۲ ژن گالاکتوزیداز، شماره ۳ پلاسمید خطی شده pET-20b

تایید اتصال قطعه به روش colony PCR :

پس از انجام لیگاسیون، سویه مستعد TOP10 با مخلوط لیگاسیون ترنسفورم شد. غربالگری جهت تایید ورود ژن *GAL* به درون پلاسمید pET-20b با استفاده از روش colony PCR انجام شد.تکثیر قطعه GAL با آغازگرهای T7pro-F و T7ter-R انجام شد که تکثیر این قطعه با این آغازگرها منجر به ایجاد قطعه‌ای با طول bp ۱۴۷۵شد(شکل ۵).

نتیجه وسترن بلات:

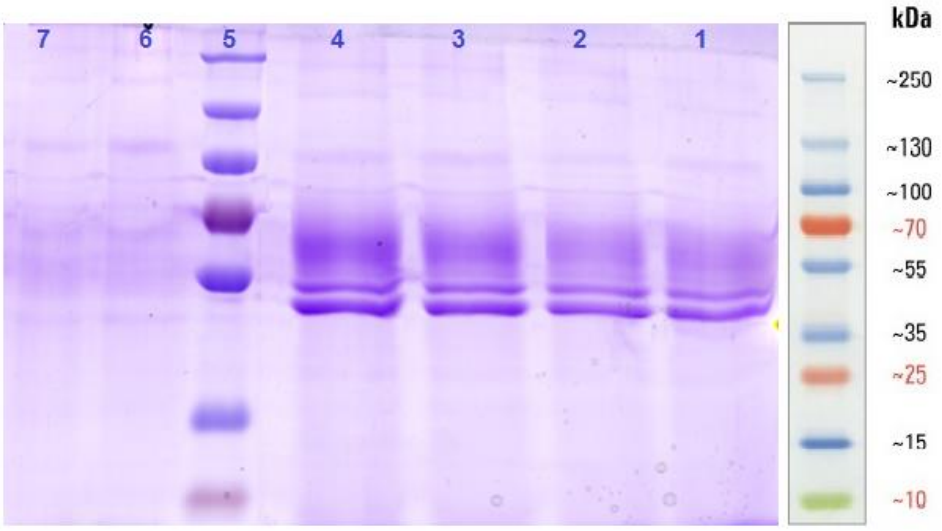
با توجه به وجود His-tag در انتهای N پروتئین بیان شده، وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی اولیه (C-myc Mouse monoclonal IgG_1) و آنتی‌بادی ثانویه(Anti-Mouse IgG-HRP) انجام شد. باندهای روشن در ناحیه ۵۵ KDa نشان‌دهنده پروتئین مورد نظر می‌باشد(شکل۶). پروتئین نوترکیب بیان شده علاوه بر His Tag دارای توالی c-myc هم بوده است لذا چون آنتی‌بادی ضد c-myc موجود بود، از آن استفاده شد. ضمناً در پروتئین محل قرار گرفتن c-myc در انتهای کربوکسی ترمینال و قبل از His Tag می‌باشد.

لذا چنانچه پروتئین به طور کامل ترجمه نشده و فاقد His tag باشد باز هم با آنتی‌بادی ضد c-myc قابل تشخیص خواهد بود و این مزیت استفاده از آنتی‌بادی c-myc است. از His tag برای تخلیص استفاده شد.

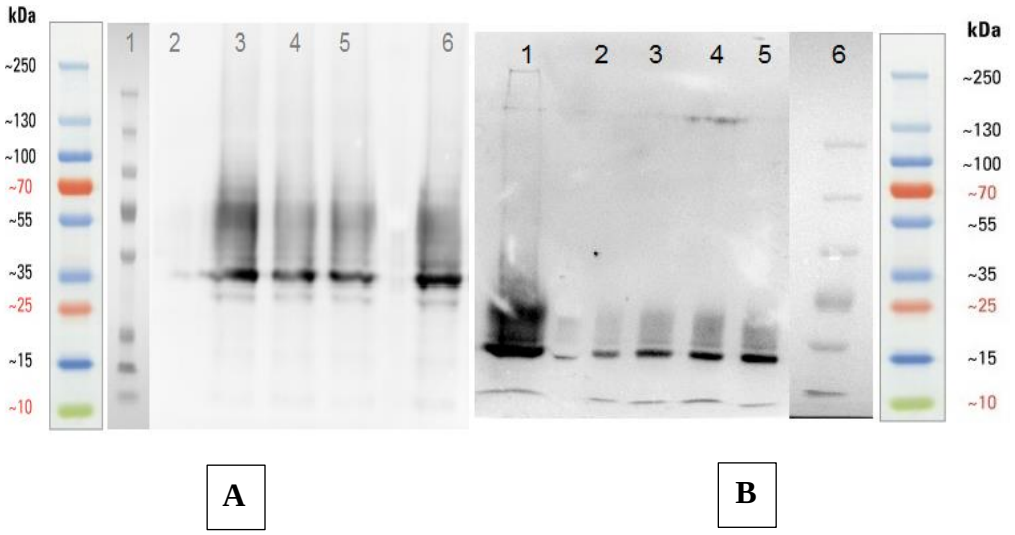
بررسی فعالیت آنزیم:

گلبول‌های قرمز شسته شده در مجاورت آنزیم قرار گرفته و سپس توسط آنتی‌سرم B از نظر وجود آنتی‌ژن B مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمون کراس‌مچ نمونه گروه خونی O تولید شده با سرم‌های گروه‌های خونی A و B و AB و O انجام شد و نتیجه با میکروسکوپ بررسی شد. دو نمونه به عنوان کنترل و ۴ نمونه جهت آزمایش بررسی شدند(شکل ۷).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

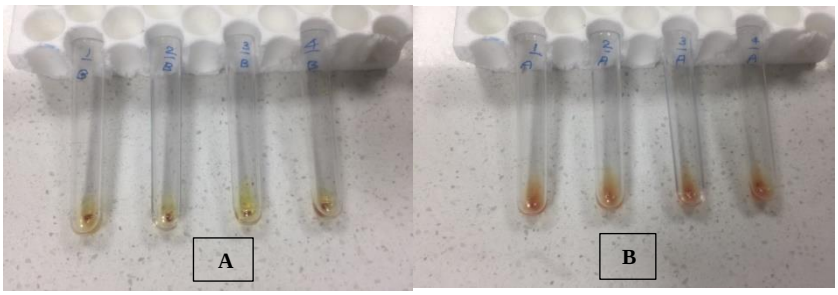


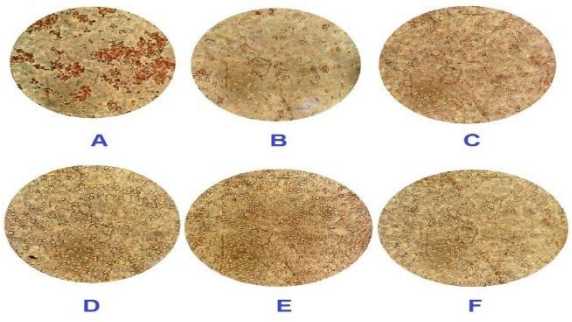
شکل۵ : نتیجه SDS-PAGE. شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ پروتئین بیان‌شده توسط کلنی‌های حاوی pET-20b-GAL . شماره ۵ مارکر پروتئینی. شماره ۶ و ۷ کلون حاوی pET-20b بدون قطعه ژنی



شکل۶ : تصویر A مربوط به Western blot از نمونه‌های سوپرناتانت لیز کشت باکتری. شماره ۱ مارکر پروتئینی. شماره ۲ نمونه کنترل منفی. شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه سوپرناتانت لیز باکتری . تصویر B مربوط به Western blot از نمونه‌های تخلیص

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]





C

شکل ۷ : تصویر A مربوط به واکنش چهار نمونه RBC با آنتی سرم Anti-B قبل از تأثیر آنزیم نوترکیب آلفا گالاکتوزیداز. واکنش آگلوتیناسیون +۴ به صورت توده RBC در زمینه شفاف نشان‌دهنده وجود آنتی‌ژن B به تعداد زیاد در سطح RBC است. تصویر B مربوط به واکنش چهار نمونه RBC با آنتی سرم Anti-B بعد از تأثیر آنزیم نوترکیب آلفا گالاکتوزیداز. واکنش آگلوتیناسیون کمتر از +۱ به صورت توده‌های بسیار کوچک در زمینه سوسپانسون RBC نشان‌دهنده حذف آنتی‌ژن‌های B از سطح RBC می‌باشد. تصویر C : نتیجه کراس‌مچ سرم‌های مختلف گروه خونی با گلبول قرمز O تولید شده. "A" نمونه کنترل(گلبول قرمز B بدون مجاورت با آنزیم + سرم فرد دارای گروه A)."B" گلبول قرمز B + سرم فرد دارای گروه A ."C" گلبول قرمز O تولید شده + سرم فرد دارای گروه AB ."D" گلبول قرمز O تولید شده + سرم فرد با گروه A . "E "گلبول قرمز O تولیدی + سرم فرد دارای گروه B ."F " گلبول قرمز O تولیدی + سرم فرد دارای گروه O .

بحث

ابداع سویه‌های جدید با مهندسی ژنتیک، قدم مهمی در بیان پروتئین‌های یوکاریوتی در *E.Coli* می‌باشد زیرا این سویه‌ها دارای توانایی اعمال تغییرات پس از ترجمه هستند(۱۱). در این پژوهش ما موفق شدیم آنزیم آلفا گالاکتوزیداز را که توانائی تبدیل گروه خونی B به گروه O را دارد در سویه rosetta 2 (DE3) بیان کنیم. گونه‌های متداول *E.Coli* برای بیان پری پلاسمیک پروتئین‌های مختلف نوترکیب عبارتند از: BL21 (DE3) ، BL21 (DE3) pLysS ، Rosetta2 (DE3) و Rosetta-gami2 (DE3) آلفا-گالاکتوزیداز از منابع مختلفی(پروانه ابریشم باف، سوسک برگخوار، قهوه سبز، قارچ آسپرژیلوس و.... جداسازی شده و ویژگی‌های آن تعیین شده است. گونه‌های Rosetta از طریق افزایش کارآیی ترجمه، بیان پروتئین‌های هدف را افزایش می‌دهند(۱۵-۱۱). اگر چه در مطالعه حاضر آنزیم به دست آمده قادر به حذف آنتی‌ژن B از سطح گلبول قرمز می‌باشد اما فعالیت ۱۰۰٪ نبوده بلکه شدت آگلوتیناسیون از +۴ قبل از اثر آنزیم به کمتر از +۱ بعد از اثر آنزیم کاهش می‌یابد.

دلایل مختلفی می‌تواند باعث این امر باشد:

اولاً با توجه به تخلیص آنزیم که فقط با ستون Ni-NTA انجام گرفت می‌توان انتظار داشت که غلظت آنزیم

در واحد حجم ناچیز بوده و به علاوه وجود مواد ممانعتی(inhibitor) همراه آنزیم موجب کاهش فعالیت آنزیم شده باشد. خالص‌سازی با روش‌های

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

دیگر مانند کروماتوگرافی علاوه بر افزایش غلظت آنزیم می‌تواند مواد ممانعتی را نیز حذف کرده و باعث ارتقای فعالیت آنزیم شود.

دوماً فعالیت حداکثری هر آنزیم مستلزم استفاده از بافر با pH و غلظت مناسب می‌باشد که در تحقیق ما به دلیل ضیق وقت انجام نشد.

ثالثاً بهینه‌سازی شرایط بیان شامل بهترین دما و نیز غلظت مناسب القاکننده(IPTG) باعث خواهد شد که شرایط لازم برای بیان حداکثری مشخص شده و بدین‌وسیله غلظت آنزیم افزایش یابد. به علاوه تغلیظ آنزیم خالص شده با روش‌هایی مانند دیالیز به افزایش فعالیت آنزیم کمک خواهد کرد.

یکی از مشکلات بیان آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در *E.coli* ، ایجاد inclusion body بود که فاقد خاصیت آنزیمی بودند. استفاده از سویه مهندسی شده این مشکل را مرتفع ساخته است. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Ahmed و همکاران انجام گرفت، بیان پری‌پلاسمیک اینترلوکین ۱۵ نوترکیب (rhIL-15) در چهار سویه *E.coli* بررسی شد. نتایج نشان داد که کمترین بیان rhIL-15 در pLysS (DE3) BL21 وجود دارد در حالی که بیشترین بیان در Rosetta-gami2 (DE3) مشاهده شد. دو سویه دیگر شامل Rosetta2 (DE3) و BL21 (DE3) بیان متوسطی از rhIL-15 نشان دادند(۱۶).

در مطالعه‌های دیگری نیز از سویه‌های مختلف برای بیان آنزیم آلفاگالاکتوزیداز استفاده شده است. به عنوان مثال، در مطالعه ژانگ و همکارانش، با کلون کردن آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در باکتری و تولید آن توانستند گروه B را به گروه O تبدیل کنند. RBCهایی که به این ترتیب تغییر گروه داده بودند از نظر طول عمر، تمامیت غشا، تغییر شکل و مورفولوژی کاملاً شبیه با RBCهای کنترل بودند(۱۷).

در مطالعه ژو و همکارانش، ژن آنزیم آلفا گالاکتوزیداز دانه قهوه را کلون کرده و آنزیم را در مقیاس زیاد در مخمر *P.pastoris* تولید کردند.

نتایج نشان داد که سکانس به دست آمده در مقایسه با دیگر کلون‌های آلفاگالاکتوزیداز استخراج شده از سایر منابع، بین ۵۲٪ تا ۸۰٪ دارای همولوژی است. آن‌ها با استفاده از این آنزیم، گروه B را به گروه O تبدیل کردند(۱۳). اگر چه نتایج ژو و همکارانش از نظر کمی و کیفی مطلوب بود لکن مشکلات کشت سلول مخمر در مقایسه با باکتری، می‌تواند نقطه منفی تحقیقات آن‌ها باشد.

در مطالعه گائو و همکارانش، توانستند با استفاده از آنزیم‌های ان-استیل گالاکتوزآمینیداز و آلفا-گالاکتوزیداز در یک بافر مشترک، گروه AB را به گروه O تبدیل کنند. واکنش آنزیمی آن‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بافرهای مختلفی برای تبدیل آنزیمی گروه‌های A و B به گروه O آزمایش شد. آن‌ها بهترین نتایج را با بافرهای گلیسین و ۵٪ گلوکز به دست آوردند. از آن جا که گلوکز یکی از اجزای اصلی بافر موجود در کیسه خون می‌باشد بنابراین، این یافته می‌تواند پیشرفت بزرگی در معمول شدن تبدیل آنزیمی گروه های خونی باشد(۱۸).

نتیجه‌گیری

بیان پروتئین یوکاریوتی در میزبان پروکاریوتی می‌تواند در تولید انبوه آنزیم گالاکتوزیداز برای کاربرد در مراکز انتقال خون کارگشا باشد. بهینه‌سازی شرایط مختلف بیان برای دستیابی به مقادیر کافی از آنزیم و نیز بهبود شرایط دمایی و شیمیایی واکنش آنزیمی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1400.095 در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال مورد تصویب قرار گرفته است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

References:

1- Yamamoto F. A historical overview of advances in molecular genetic/genomic studies of the ABO blood group system. Glycoconj J 2022; 39(2): 207-18.
2- Gandhi MJ, Strong D, Whitaker BI, Petrisli E. A brief overview of clinical significance of blood group antibodies. Immunohematology 2018; 33(1): 4-6.
3- Harmening DM, Forneris G, Tubby B. The ABO blood group system. In: Modern Blood Banking & Transfusion Practices Philadelphia, PA: FA Davis Company; 2012. p. 119-48.
4- Selleng K, Jenichen G, Denker K, Selleng S, Müllejans B, Greinacher A. Emergency transfusion of patients with unknown blood type with blood group O Rhesus D positive red blood cell concentrates: a prospective, single-centre, observational study. Lancet Haematol 2017; 4(5): e218-e24.
5- Shahverdi E, Moghaddam M, Talebian A, Abolghasemi H. Distribution of blood groups in the Iranian general population. Immunohematology 2016; 32(4): 135-9.
6- Bakunina IY, Sova V, Nedashkovskaya O, Kuhlmann R, Likhosherstov L, Martynova M, *et al*. Alpha-galactosidase of the marine bacterium Pseudoalteromonas sp. KMM 701. Biochemistry (Mosc) 1998; 63(10): 1209-15.
7- Golotin V, Balabanova L, Noskova YA, Slepchenko L, Bakunina IY, Vorobieva N, *et al*. Optimization of cold-adapted alpha-galactosidase expression in Escherichia coli. Protein Expr Purif 2016; 123: 14-8.
8- Bhatia S, Singh A, Batra N, Singh J. Microbial production and biotechnological applications of α-galactosidase. Int J Biol Macromol 2020; 150: 1294-1313.
9- Balabanova L, Bakunina IY, Likhatskaya G, Zvyagintseva T, Rasskazov V, editors. Glycoside hydrolases of marine bacteria are promising tools in haemotherapy. The Second International Conference on Bioenvironment, Biodiversity and Renewable Energies Bionature, Venice; 2011. p. 47-50.
10- Bakunina IY, Balabanova LA, Pennacchio A, Trincone A. Hooked on α-D-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis. Crit Rev Biotechnol 2016; 36(2): 233-45.
11- Hon J, Marusiak M, Martinek T, Kunka A, Zendulka J, Bednar D, *et al*. SoluProt: prediction of soluble protein expression in Escherichia coli. Bioinformatics 2021; 37(1): 23-8.
12- Sourakov A, Paris Th. Fall Webworm, Hyphantria cunea (Drury) (Insecta: Lepidoptera: Arctiidae: Arctiinae). Available from: https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN878/IN878-D4sxx7ox78.pdf.
13- Zhu A, Leng L, Monahan C, Zhang Z, Hurst R, Lenny L, *et al*. Characterization of recombinant α-galactosidase for use in seroconversion from blood group B to O of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1996; 327(2): 324-9.
14- Weignerová L, Filipi T, Manglová D, Křen V. Induction, purification and characterization of α-N-acetylgalactosaminidase from Aspergillus Niger. Appl Microbiol Biotechnol 2008; 79(5): 769-74.
15- Olsen SK, Ota N, Kishishita S, Kukimoto-Niino M, Murayama K, Uchiyama H, *et al*. Crystal structure of the interleukin-15· interleukin-15 receptor α complex: insights into trans and cis presentation. J Biol Chem 2007; 282(51): 37191-204.
16- Ahmed N, Afroze B, Abbas R, Khan MA, Akram M, Tahir S, *et al*. Method for efficient soluble expression and purification of recombinant human interleukin-15. Protein Expr Purif 2021; 177: 105746.
17- Zhang YP, Gong F, Bao GQ, Gao HW, Ji SP, Tan YX, *et al*. B to O erythrocyte conversion by the recombinant α-galactosidasc. Chin Med J (Engl) 2007; 120(13): 1145-50.
18- Gao H, Li S, Tan Y, Ji S, Wang Y, Bao G, *et al*. Application of α-N-acetylgalactosaminidase and α-galactosidase in AB to O red blood cells conversion. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2013; 41(1): 32-6.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (4): 301-312

Original Article

Cloning and expression a-galactosidase in order to convert B to O blood group

Hadad Deilami A.[1], Salehi M.[1], Shahabi M.[2]

[1]Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
[2]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The shortage of different ABO blood groups is a permanent problem that many blood transfusion centers encounter. The conversion of blood group A and B to group O is a solution to this problem. In this research we aimed to clone and express the α-galactosidase enzyme gene to convert the blood group B to O.

Materials and Methods

In this experimental study, the α-galacosidase gene from coffee bean was codon-optimized and cloned into the pBHA plasmid. After replication in *E. coli*, plasmid was cut with BamH1 and Nco1 restriction enzymes and the α-galacosidase gene was purified by gel electrophoresis. The gene was then cloned into the expression vector, pET-20b. The expression construct was introduced into E. coli Rosetta 2 (DE3) and the expression of the enzyme was induced by IPTG. The presence of protein production was investigated using SDS-PAGE and Western blotting. Protein function test was also evaluated by the ability of B cells to convert to O cells.

Results

The presence of the recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot assay. The purified protein could partially convert blood group B RBCs into group O as detected by decreasing the agglutination strength with B antiserum from 4+ to less than 1+.

Conclusions

The production of eukaryotic proteins in a prokaryotic host is a major step in mass production. Optimization of different expression conditions is essential to achieve sufficient amount of enzyme.

Key words: Blood Group, Galactosidase, *E coli*

Received: 29 May 2022
Accepted: 10 Sep 2022

Correspondence: Salehi M., PhD of Cellular & Molecular Biology. Assistant Professor of Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch.
Postal Code: 1651153511 Tehran, Iran. Tel: (+9821) 77009801; Fax: (+9821) 77009848
E-mail: *mitra_salehi_microbiology@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-12]