Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Expression of human alpha-lactalbumin using a chloroplast-based construct in *Escherichia coli*

Maryam Ehsasatvatan

Post-Doctoral Researcher, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: ehsasatvatan@tabrizu.ac.ir

Bahram Baghban Kohnehrouz

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

Abstract

Objective

With the increasing global demand for high-quality protein sources, the recombinant production of human milk proteins has gained attention as a safe, nutritious, and sustainable alternative. This study aimed to design and perform a preliminary evaluation of a chloroplast-compatible expression cassette containing the human α-lactalbumin gene in *Escherichia coli*, as an initial step toward plant-based production of this protein.

Materials and methods

The coding sequence of human α-lactalbumin was codon-optimized based on the preferred codon usage of tobacco chloroplasts and assembled into an expression cassette consisting of the *rrn* promoter, the 5′ untranslated region (UTR) of T7 phage gene 10, and the *rrnB* terminator. The cassette was cloned into the chloroplast vector pPRV111A and validated by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Translational efficiency was assessed by transformation of the recombinant plasmid into *E. coli* strain BL21 (DE3) and protein expression induction using IPTG. The recombinant protein was purified via nickel-based affinity chromatography, followed by His-tag removal using TEV protease. The HAMLET complex was formed by combining the purified protein with oleic acid, and its biological activity was assessed using the MTT assay on WiDr colorectal cancer cells.

Results

Human α-lactalbumin was successfully expressed in in *E. coli* in soluble form, with an approximate molecular weight of 16 kDa. Efficient purification from the soluble protein fraction and successful removal of the His-tag yielded a final product of ~14 kDa. Western blotting and SDS-PAGE verified successful expression and high protein purity. The HAMLET complex formed by combining the purified protein with oleic acid significantly reduced the viability of WiDr cells in the MTT assay. Specifically, treatment with 21 µM HAMLET resulted in a 96% decrease in cell survival, whereas treatments with α-lactalbumin or oleic acid alone had no significant effect. These findings demonstrate that the expressed protein retained both correct structural integrity and expected biofunctional properties.

Conclusions

The designed expression cassette showed high efficiency in the bacterial system and enabled the production of biologically active human α-lactalbumin. This study provides experimental evidence supporting the feasibility of using the designed construct for chloroplast transformation in plants, representing a promising step toward the industrial production of recombinant α-lactalbumin and its bioactive derivatives such as HAMLET.

Keywords: Human α-lactalbumin, Bacterial expression, Whey protein, Chloroplastic vector.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ehsasatvatan, M., & Baghban kohnehrouz, B. (2026). Expression of human α-lactalbumin using a chloroplast-based construct in *Escherichia coli*. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(1), 77-96.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(1), 77-96. DOI: 10.22103/jab.2025.25532.1729

Received: October 02, 2025. Received in revised form: December 20, 2025.

Accepted: December 21, 2025. Published online: January 15, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

The rising global need for safe, high-quality protein sources has sparked significant interest in developing alternative biotechnological methods for producing functional proteins. Human α-lactalbumin (hLA), a key whey protein found in breast milk, has garnered attention due to its rich

nutritional content, bioavailability, and strong biological activity. It is crucial for lactose biosynthesis and plays a vital role in neonatal development by supplying essential amino acids. Remarkably, α-lactalbumin can form a cytotoxic complex with oleic acid, known as HAMLET (Human Alpha-Lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), which selectively triggers apoptosis in tumor cells while leaving normal cells unharmed. Despite its therapeutic and nutritional potential, the large-scale production of recombinant hLA is hindered by the limitations of traditional expression systems. Mammalian systems are expensive and present biosafety issues, whereas microbial hosts, such as *Escherichia coli*, often produce misfolded proteins or inclusion bodies. In this scenario, chloroplast genetic engineering in plants has emerged as a promising alternative. Chloroplasts can express recombinant proteins at high levels, have prokaryotic-like transcription and translation systems, and allow stable transgene integration without silencing. However, the successful expression of eukaryotic proteins in chloroplasts necessitates the careful design of specialized expression cassettes that are compatible with plastid-specific regulatory elements.
This study aimed to design a chloroplast-targeted expression cassette for human α-lactalbumin and assess its translational efficiency in a bacterial model (*E. coli*). The successful validation of this system in prokaryotic cells would support its subsequent use in chloroplast transformation and plant-based biomanufacturing.

Materials and methods

The amino acid sequence of human α-lactalbumin was obtained from UniProt (Accession No. P00709), and the corresponding nucleotide sequence was optimized for chloroplast expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) using EMBOSS Backtranseq. A synthetic gene was constructed by incorporating key regulatory elements: the *Prrn* promoter from the tobacco *rrn* operon, the 5′ untranslated region (5′ UTR) of T7 gene 10 (T7g10), which is known to enhance translation efficiency, and the *rrnB* terminator from *E. coli* for transcriptional termination. A 6xHis tag and TEV protease cleavage site were added at the N-terminus of hLA protein to facilitate purification and tag removal, respectively. The synthetic cassette was cloned into pUC57 and then subcloned into the *Hind*III and *Pst*I restriction sites of pPRV111A plastid vector. Restriction digestion and PCR amplification using gene-specific primers was used to confirmation of the recombinant plasmid (pPRV-hLA). The recombinant plasmid was introduced into *E. coli* strain BL21 (DE3) using a heat shock method. When the culture reached an OD600 of 0.6–0.8 expression was induced with 1 mM IPTG, and the cells were incubated for 16 h at 25°C to promote soluble expression. Bacterial pellets were collected by centrifugation and lysed using a sonicator in the presence of a protease inhibitor. Total soluble proteins were isolated by centrifugation and stored at –20°C. Ni-NTA affinity chromatography was used purification of

recombinant hLA from the soluble fraction. The His-tag was enzymatically removed by incubation with TEV protease, and the Ni- Same Ni-NTA column was used to separate cleaved product from the mixture. To assess the functional activity of the recombinant protein, the HAMLET complex was prepared by incubating purified hLA with oleic acid under mild heat and agitation. MTT assay was used to evaluate the cytotoxic activity of HAMLET on WiDr colorectal cancer cells. The treatments included: (i) 21 μM HAMLET, (ii) 21 μM purified hLA, (iii) 2.5 mM oleic acid, (iv) total soluble protein (TSP) from non-recombinant *E. coli*, and (v) culture medium as the negative control.

Results

Successful integration of the synthetic gene into the pPRV111A vector was confirmed using PCR analysis and restriction digestion. SDS-PAGE analysis revealed a prominent protein band at ~16 kDa in the soluble protein fraction of recombinant *E. coli* cultures, consistent with the expected size of His-tagged hLA. This band was absent in the control cells containing the empty vector. Specific expression of the recombinant protein was confirmed via western blot analysis using an anti-His antibody. Ni-NTA purification produced high-purity hLA, as evidenced by a single band on SDS-PAGE. TEV protease treatment resulted in protein's molecular weight shifted to ~14 kDa, indicating the successful removal of the His-tag while retaining the core hLA sequence. The HAMLET complex was successfully formed by incubating purified hLA with oleic acid. MTT assay results demonstrated a strong cytotoxic effect of HAMLET on WiDr cells, with a 96% reduction in cell viability after 6 hours of treatment. In contrast, treatment of cells with hLA or oleic acid alone showed minimal cytotoxicity, confirming the necessity of both components for their full activity. Cells treated with protein extracts from non-recombinant bacteria showed no significant effects compared to the negative control. These findings collectively validate the correct expression, purification, and functional activity of recombinant hLA derived from the chloroplast expression cassette in a bacterial system.

Conclusions

The chloroplast-compatible expression cassette designed in this study demonstrated high translational efficiency and enabled the production of soluble, biologically active human α-lactalbumin in *E. coli*. The use of chloroplast-specific regulatory elements such as the *Prrn* promoter, T7g10 5′ UTR, and *rrnB* terminator proved effective in directing strong expression in a prokaryotic host, supporting their anticipated performance in plastid environments. The successful formation of the HAMLET complex and its pronounced cytotoxic effect on WiDr cancer cells confirmed the functional integrity of the recombinant protein. These results serve as

a robust proof-of-concept for future implementation of this cassette in plastid transformation of tobacco and potentially other plant species for the production of functional milk-derived proteins. Given the scalability, safety, and cost-effectiveness of plant-based expression systems, this study establishes a foundational step toward the industrial-scale biosynthesis of therapeutic and nutritional proteins such as hLA. Moreover, the plant-based production of HAMLET may offer a novel and sustainable approach to cancer therapy and nutritional supplementation in the future.

Author contributions

M. E. conceived the study, designed the experiments, performed the experimental assays, analyzed the data, and drafted the manuscript. B. B. K. supervised the research, contributed to the experimental design, provided critical revisions, and approved the final version of the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Data availability statement

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. Additional raw data or materials are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors would like to thank the University of Tabriz for providing the laboratory facilities and technical support required for the successful completion of this research.

Ethical Considerations

Not applicable.

Funding

This research was financially supported by the Iran National Science Foundation (INSF) under grant number 4027239. The funding organization had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بیان پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی با استفاده از سازه کلروپلاستی در باکتری *Escherichia coli*

مریم احساساتوطن

پژوهشگر پسادکتری، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: ehsasatvatan@tabrizu.ac.ir

بهرام باغبان کهنه‌روز

*نویسنده مسئول: استاد، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۳۰

چکیده

هدف: با افزایش تقاضای جهانی برای منابع پروتئینی با کیفیت بالا، تولید نوترکیب پروتئین‌های شیر انسانی به‌عنوان گزینه‌ای ایمن، مغذی و پایدار مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش با هدف طراحی و ارزیابی اولیه یک کاست بیانی کلروپلاستی حاوی ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی در باکتری *Escherichia coli* به‌عنوان گام مقدماتی در مسیر تولید گیاهی این پروتئین انجام شد.

مواد و روش‌ها: توالی رمزکننده آلفا-لاکتالبومین انسانی با کدون‌های ترجیحی کلروپلاست توتون بهینه‌سازی و در قالب یک کاست بیانی شامل راه‌انداز *rrn*، ناحیه 5′UTR ژن ۱۰ فاژ T۷ و پایان‌دهنده *rrnB* طراحی گردید. این سازه در ناقل کلروپلاستی pPRV111A همسانه‌سازی شد و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیمی، صحت ساختاری آن تأیید شد. جهت ارزیابی کارایی ترجمه، پلاسمید نوترکیب به *E. coli* سویه BL21 (DE3) منتقل و القای بیان با IPTG انجام شد. پروتئین حاصل با روش کروماتوگرافی تمایلی بر پایه رزین نیکل تخلیص و پس از حذف برچسب هیستیدینی با آنزیم TEV، مجموعه HAMLET با اسید اولئیک تولید گردید. فعالیت زیستی این مجموعه با آزمون MTT روی رده سلولی WiDr ارزیابی شد.

نتایج: پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی با وزن تقریبی ۱۶ کیلو دالتون به‌صورت محلول در باکتری بیان شد. خالص‌سازی مؤثر پروتئین از بخش محلول سلولی و حذف موفق برچسب هیستیدینی، منجر به تولید پروتئینی با وزن نهایی حدود ۱۴ کیلو دالتون شد. آزمون‌های تأییدی شامل لکه‌گذاری وسترن و SDS-PAGE بیان موفق و خلوص بالای پروتئین را تأیید کردند. مجموعه HAMLET تهیه‌شده با ترکیب این پروتئین و اسید اولئیک، در آزمون MTT موجب کاهش قابل‌توجه زنده‌مانی رده سلولی

WiDr شد. به‌طور خاص، تیمار سلول‌ها با ۲۱ میکرومولار HAMLET باعث کاهش ۹۶ درصدی بقاء سلولی گردید، در حالی‌که تیمارهای جداگانه با آلفا-لاکتالبومین یا اسید اولئیک فاقد اثر معنی‌دار بودند. این نتایج نشان دادند که پروتئین تولیدشده نه‌تنها از نظر ساختاری صحیح است، بلکه ویژگی‌های عملکردی و زیستی مورد انتظار خود را نیز حفظ کرده است.

نتیجه‌گیری: کاست بیانی طراحی‌شده دارای کارایی بالا در سیستم باکتریایی بوده و توانسته پروتئینی با فعالیت زیستی مطلوب تولید کند. این مطالعه شواهدی تجربی برای امکان‌سنجی استفاده از این سازه در تراریختی کلروپلاست گیاهان فراهم کرده و گامی مؤثر در مسیر تولید صنعتی آلفا-لاکتالبومین انسانی و ترکیبات زیست‌فعال مشتق از آن مانند HAMLET محسوب می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آلفا-لاکتالبومین انسانی، بیان باکتریایی، پروتئین وی، ناقل کلروپلاستی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: احساسات‌وطن مریم، باغبان کهنه‌روز بهرام (۱۴۰۵) بیان پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی با استفاده از سازه کلروپلاستی در باکتری *Escherichia coli*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۷۷-۹۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

با افزایش جمعیت جهان، تقاضا برای پروتئین غذایی با کیفیت بالا به سرعت در حال افزایش است. طبق پیش‌بینی‌های سازمان ملل، جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد نفر خواهد رسید. در نتیجه، با افزایش ۲۳ درصدی تقاضا برای پروتئین‌های غذایی، اگر هر فرد به‌طور متوسط به ۸۰ گرم پروتئین در روز نیاز داشته باشد، میزان تقاضای جهانی برای پروتئین تا سال ۲۰۵۰ به حدود ۲۸۰ میلیون تن خواهد رسید (Willett et al., 2019). محصولات غذایی با منبع حیوانی نقش مهمی در رژیم‌های غذایی جهانی ایفا می‌کنند و به‌طور میانگین ۱۷ درصد از انرژی و ۳۵ درصد از پروتئین روزانه را تأمین می‌کنند (Miller et al., 2022). روش‌های سنتی تولید مواد غذایی، به دلیل چالش‌هایی همچون آلودگی محیط‌زیست، تغییرات اقلیمی و محدودیت منابع، توانایی تأمین پایدار و ایمن پروتئین‌های غذایی مورد نیاز را ندارند (Crippa et al., 2021). از این رو، توسعه جایگزین‌هایی مانند محصولات لبنی گیاهی در دستور کار مراکز تحقیقاتی و صنایع غذایی قرار گرفته است. با وجود این، ترکیبات گیاهی قادر به تأمین کامل کیفیت تغذیه‌ای لبنیات نیستند؛ چراکه لبنیات منبعی غنی از پروتئین‌های با ارزش زیستی بالا و ریزمغذی‌های ضروری به‌شمار می‌روند (Springmann et al., 2018). همچنین، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های گیاهی مانند حلالیت، توان ژل شدن و خاصیت امولسیون‌کنندگی غالباً پایین‌تر از پروتئین‌های شیر گزارش شده است (Qamar et al., 2020). با توجه به محدودیت‌های جایگزینی کامل شیر با منابع گیاهی، تولید نوترکیب پروتئین‌های طبیعی شیر، به‌ویژه پروتئین‌های وی (Whey)،

به‌عنوان یک راهکار علمی و فناورانه مطرح شده است. پروتئین‌های شیر به‌دلیل داشتن تمام اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری برای رشد و نمو انسان، از قابلیت جذب و زیست‌فراهمی (Bioavailability) بالایی برخوردارند (Séverin & Wenshui, 2005). این پروتئین‌ها را می‌توان در تولید پودرهای پروتئینی جهت استفاده به‌عنوان مکمل غذایی برای گروه‌های خاص مانند نوجوانان، ورزشکاران و زنان به‌کار گرفت (Desbrow et al., 2019). در شیر انسان بیش از ۴۰۰ نوع پروتئین شناسایی شده‌اند که در میان آن‌ها، آلفا-لاکتالبومین با سهم حدود ۲۵ تا ۳۵ درصد از کل پروتئین شیر و ۴۱ درصد از پروتئین‌های وی، به‌عنوان پروتئین غالب شناخته می‌شود (Kim & Yi, 2020; Park & Haenlein, 2013). این پروتئین کروی کوچک با وزن مولکولی تقریبی ۱۴ کیلو دالتون و pH ایزوالکتریک ۴ تا ۵، دارای غلظت بالایی از سیستین و تریپتوفان است و به‌عنوان یکی از دو زیرواحد آنزیم لاکتوز سنتاز در سنتز لاکتوز عمل می‌کند (Sadovnikova et al., 2021). همچنین، دارای یک محل اتصال قوی Ca^{2+} بوده و به عنوان یک مدل ساده پروتئین اتصالی به Ca^{2+} عمل می‌کند (Permyakov, 2020). مطالعات متعددی اثرات مفید تغذیه‌ای و درمانی آلفا-لاکتالبومین، از جمله بهبود عملکرد شناختی در شرایط استرس، فعالیت ضدباکتریایی و القای آپوپتوز در سلول‌های توموری را نشان داده‌اند (Chetta et al., 2021; Hakansson et al., 2011; Layman et al., 2018). با توجه به این ویژگی‌ها، بازار جهانی آلفا-لاکتالبومین روندی رو به رشد دارد و پیش‌بینی می‌شود از ۹۵۰ میلیون دلار در سال ۲۰۲۳ به ۱۷۴۸ میلیون دلار تا سال ۲۰۳۱ برسد (Market Research Intellect, 2023). با این وجود، تولید این پروتئین از منابع حیوانی محدودیت‌هایی دارد و استفاده از سیستم‌های بیانی نوترکیب، از جمله باکتری، مخمر، سلول پستانداران و اخیراً گیاهان، به‌عنوان گزینه‌های جایگزین مطرح شده‌اند. اگرچه سیستم‌های بیان سنتی کارایی بالایی دارند، اما هزینه زیاد، نیاز به شرایط استریل، فرآیندهای استخراج و تخلیص پیچیده، نیاز به زنجیره سرد در ذخیره‌سازی، و خطر آلودگی‌های انسانی از معایب آن‌ها هستند (Daniell, Singh, et al., 2009; Kwon et al., 2013). بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان، به‌ویژه از طریق کلروپلاست، می‌تواند جایگزینی ایمن، کم‌هزینه و با ظرفیت تولید بالا فراهم کند. سیستم‌های بیان کلروپلاستی به‌دلیل ویژگی‌هایی نظیر توارث مادری، پلی‌پلوئیدی، سطح بیان بالا، درج هدفمند ژن، و نبود خاموشی ژن، گزینه مناسبی برای تولید پروتئین‌های غذایی به‌شمار می‌روند (Adem et al., 2017; Khan, 2012). از منظر اقتصادی، سیستم‌های بیان کلروپلاستی در گیاهان به‌دلیل هزینه پایین تولید، عدم نیاز به تجهیزات استریل و قابلیت تولید انبوه، گزینه‌ای مقرون‌به‌صرفه‌تر نسبت به سامانه‌های پستانداری یا تخمیری محسوب می‌شوند و می‌توانند هزینه تولید پروتئین‌های نوترکیب را تا ده‌ها برابر کاهش دهند (Adem et al., 2017; Daniell, Ruiz, et al., 2009; Maliga & Bock, 2011). با توجه به نبود گزارش مستندی از بیان آلفا-لاکتالبومین انسانی در کلروپلاست گیاهان، هدف این پژوهش طراحی یک کاست بیانی کلروپلاستی بهینه‌شده حاوی ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی و ارزیابی اولیه کارایی آن در سیستم باکتریایی *E. coli* به‌عنوان میزبان مدل و پیش‌نیاز برای استفاده در تراریختی کلروپلاست توتون است. موفقیت در بیان باکتریایی، می‌تواند مبنای توسعه مسیر تولید صنعتی این پروتئین عملکردی در گیاهان را فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

بازیابی توالی پروتئین و بهینه‌سازی کدونی: توالی آمینواسیدی آلفا-لاکتالبومین انسانی از پایگاه داده UniProt با شماره دسترسی P00709 در قالب FASTA بازیابی و توالی پپتید نشانه از انتهای آمینی آن حذف شد. توالی نوکلئوتیدی بهینه‌شده برای بیان در کلروپلاست توتون از ترجمه معکوس توالی پروتئینی با استفاده از کدون‌های ترجیحی کلروپلاست توتون از طریق ابزار آنلاین EMBOSS Backtranseq به دست آمد.

طراحی کاست بیانی حاوی ژن آلفا لاکتالبومین انسانی: پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی و به دست آوردن توالی نوکلئوتیدی آلفا-لاکتالبومین انسانی و قطعات مورد نیاز رونویسی شامل راه‌انداز، 5′ UTR و خاتمه‌دهنده، اقدام به طراحی کاست بیانی شد. به منظور تسهیل خالص‌سازی پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی تولید شده در پلاست‌ها از توالی نوکلئوتیدی مربوط به برچسب هیستیدینی متصل به انتهای آمینی و جهت جداسازی برچسب هیستیدینی پس از خالص‌سازی پروتئین، از جایگاه برش پروتئازی TEV در حدفاصل برچسب هیستیدینی و توالی رمز کننده آلفا-لاکتالبومین انسانی استفاده شد. مکان‌های برشی *Nco*I و *Xho*I به ترتیب در انتهای ′۵ و ′۳ توالی رمز کننده آلفا-لاکتالبومین انسانی در نظر گرفته شد. از توالی راه‌انداز *rrn* توتون (*Prrn*) و توالی 5′ UTR بهینه‌سازی شده ژن ۱۰ فاژ T۷ (T7g10) استفاده شد. از توالی پایان‌دهنده اپرون *rrnB* باکتری *E. coli* نیز در پایین دست توالی رمز کننده ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی استفاده شد. مکان‌های برشی *Hind*III در ابتدای راه‌انداز، *Sal*I در ابتدای ′۵ UTR و *Pst*I/*Kpn*I/*Sac*I در انتهای توالی پایان‌دهنده در نظر گرفته شد. کاست طراحی‌شده به شرکت GenScript (ایالات متحده) ارسال و پس از سنتز، در وکتور pUC57 در محل برش *Eco*RV همسانه‌سازی شد.

تهیه ناقل پلاستیدی توتون حاوی ژن رمز کننده آلفا-لاکتالبومین انسانی: پس از دریافت کاست سنتز شده ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی در ناقل pUC57، زیرهمسانه‌سازی آن در ناقل کلروپلاستی pPRV111A انجام شد (شکل ۱، A) (Zoubenko et al., 1994). به‌این‌منظور، پلاسمید pUC57-hLA با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Pst*I برش داده شد و قطعه نوترکیب به طول ۸۱۵ جفت‌باز استخراج شد. قطعه حاصل با استفاده از آنزیم T4 DNA لیگاز به جایگاه همسان *Hind*III/*Pst*I در ناقل pPRV111A وارد شد. فرآیند تراریختی باکتری *E. coli* سویه DH5α با روش انجماد-ذوب انجام گرفت (Sambrook & Russell, 2001). کلنی‌های نوترکیب با استفاده از محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/mL) انتخاب شدند. استخراج پلاسمید از کلنی‌های منتخب با روش mini-prep (Bimboim & Doly, 1979) انجام شد و تأیید صحت درج ژن هدف در وکتور نوترکیب، با استفاده از آنالیز PCR اختصاصی و برش آنزیمی صورت گرفت (جدول ۱).

بیان پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی در باکتری و استخراج پروتئین کل: برای ارزیابی کارایی کاست بیانی طراحی‌شده، پلاسمید نوترکیب حاوی ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی به روش شوک حرارتی به *E. coli* سویه BL21 (DE3) منتقل شد. باکتری‌های تراریخته در محیط مایع LB حاوی اسپکتینومایسین (۸۰ µg/mL) و آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/mL) کشت

داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ rpm به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، ۲۰ میلی‌لیتر از کشت شبانه به یک لیتر محیط تازه منتقل شد و رشد باکتری تا رسیدن به OD600 بین ۰/۶ تا ۰/۸ ادامه یافت. القای بیان پروتئین با افزودن ۱ میلی‌مولار ایزوپروپیل-β-D-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد و کشت به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از سانتریفیوژ شدن در ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه، رسوب سلولی در ۳۰ میلی‌لیتر بافر لیز حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH برابر با ۸) ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و مهارکننده‌های پروتئاز حل شد. سپس سلول‌ها در پنج چرخه سونیکاسیون (۱۰ ثانیه پالس و ۴۰ ثانیه استراحت روی یخ، با شدت ۷۰ درصد) لیز شدند. مخلوط حاصل با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صاف شد. پروتئین محلول در فاز فوقانی تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت پروتئین با روش برادفورد تعیین گردید (Bradford, 1976).

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تأیید درج تراژن

Table 1. Sequences of used primers for confirmation of gene integration

آغازگر Primer	توالی 3′-5′ Sequence (5′-3′)	دمای ذوب (°C) Tm (°C)
P1	AGGTACTTGAGAAGATTTACACCA	57.3
P2	TGGAGGAATTGCTTTACCTGAA	57.6

لکه‌گذاری وسترن: برای تأیید بیان پروتئین هدف، نمونه‌ی پروتئین کل استخراج‌شده با بافر نمونه ترکیب و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲ درصد بر پایه روش Laemmli (Laemmli, 1979) بارگذاری و الکتروفورز شدند. انتقال پروتئین‌ها به غشاء نیتروسلولز با دستگاه Mini Trans-Blot (Bio-Rad) در دمای ۴ درجه و ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۱ ساعت انجام شد. شناسایی ایمنی‌شناختی پروتئین آلفا-لاکتالبومین حاوی برچسب هیستیدینی با استفاده از آنتی‌بادی اولیه خرگوشی ضد His-tag و آنتی‌بادی ثانویه بزی متصل به HRP انجام گرفت.

خالص‌سازی پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی: پروتئین نوترکیب از بخش محلول پروتئین کل باکتری به‌وسیله کروماتوگرافی تمایلی با رزین نیکل (Ni-NTA، QIAGEN) تخلیص شد. به‌منظور آماده‌سازی ستون، ۱/۵ میلی‌لیتر از رزین در لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از حذف بافر نگهدارنده، دو بار با آب مقطر استریل و سپس دو بار با بافر متعادل‌سازی (PBS 1×، حاوی ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl) شستشو داده شد. محلول حاوی پروتئین رقیق‌شده (نسبت ۳:۱ با بافر متعادل‌سازی) به رزین افزوده و مخلوط به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با تکان آرام انکوبه شد. سپس مخلوط به ستون منتقل شده و پروتئین‌های غیرمتصل با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه خارج شدند. رزین دو بار با بافر شستشو (PBS 1×، ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۲۵ میلی‌مولار ایمیدازول) پاک‌سازی شد. در نهایت، پروتئین متصل به رزین با بافر واجد ۲۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول (در PBS 1×

و ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl) جدا و در لوله‌های استریل جمع‌آوری گردید. تخلیص پروتئین با ژل پلی‌اکریلامید ۱۲/۵درصد بررسی شد.

برش پروتئازی و جداسازی برچسب هیستیدینی: برای حذف برچسب هیستیدینی از پروتئین نوترکیب، نمونه خالص‌شده ابتدا در برابر محلول بافر دیالیز (۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH 8.0) دیالیز شد. سپس پروتئاز TEV به‌نسبت ۰/۵ واحد آنزیم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین افزوده و واکنش برش به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در پایان، محلول واکنش مجدداً از ستون Ni-NTA عبور داده شد تا پروتئین بدون برچسب جمع‌آوری شود.

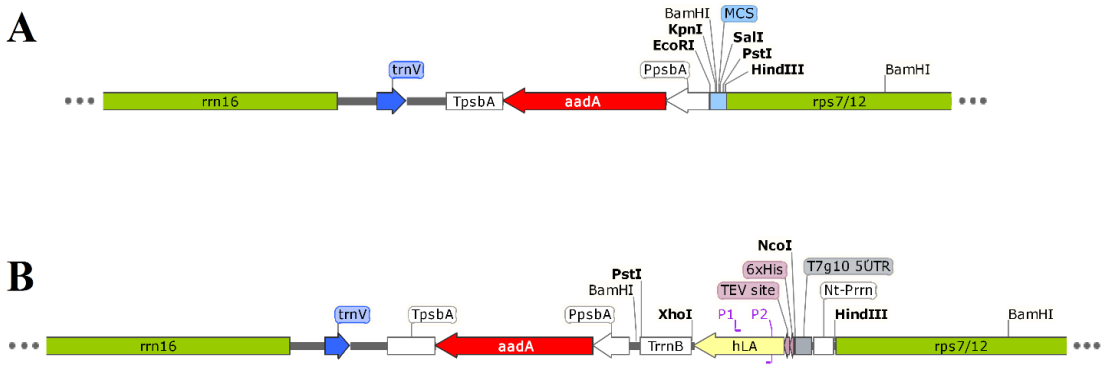
تشکیل مجموعه HAMLET: مجموعه HAMLET از ترکیب پروتئین آلفا-لاکتالبومین خالص‌سازی شده و اسید اولئیک به روش تیمار حرارتی به دست آمد (Kamijima et al., 2008). برای تشکیل مجموعه HAMLET، پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی خالص‌شده به غلظت نهایی ۲۱۰ میکرومولار در PBS رقیق گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با تکان آرام نگهداری شد. سپس اسید اولئیک به آن افزوده و مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه دیگر در همان دما و شرایط انکوبه گردید. پس از سرد شدن، اسید اولئیک اضافی با سانتریفیوژ حذف شد و محصول نهایی تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش بقای سلولی: برای ارزیابی زیست‌فعالی مجموعه HAMLET، رده سلولی سرطان کولورکتال WiDr در محیط DMEM حاوی ۱۰درصد سرم جنینی گاوی، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) کشت داده شد. سلول‌ها با تراکم ۲×۱۰^{۶} در پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته و پس از ۲۴ ساعت تیمار شدند. تیمارها شامل: ۲۱ میکرومولار HAMLET، ۲۱ میکرومولار آلفا-لاکتالبومین خالص‌شده از باکتری، ۲/۵ میلی‌مولار اسید اولئیک، پروتئین کل از باکتری غیر نوترکیب و محیط کشت (کنترل منفی) بودند. پس از ۶ ساعت تیمار و ۱۸ ساعت انکوباسیون در محیط تازه، آزمون MTT برای سنجش بقاء سلولی انجام شد. فورمازان تولید شده در دی‌متیل‌سولفوکسید حل و جذب آن در طول موج ۶۲۰/۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار مستقل گزارش گردید.

نتایج

طراحی کاست بیانی پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی: کاست بیانی طراحی‌شده برای آلفا-لاکتالبومین انسانی مبتنی بر ناقل کلروپلاستی pPRV111A بود. این ناقل دارای توالی‌هایی از جمله ژن مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین (aadA) و نواحی نوترکیبی rps12 و rrn16 است که امکان درج هدفمند ژن مورد نظر را در ژنوم کلروپلاست فراهم می‌کنند (شکل ۱، A). توالی رمزکننده آلفا-لاکتالبومین انسانی با استفاده از ترجمه معکوس توالی پروتئینی UniProt (P00709) و بهینه‌سازی بر اساس کدون‌های ترجیحی کلروپلاست توتون طراحی شد. به‌منظور تسهیل تشخیص و خالص‌سازی پروتئین

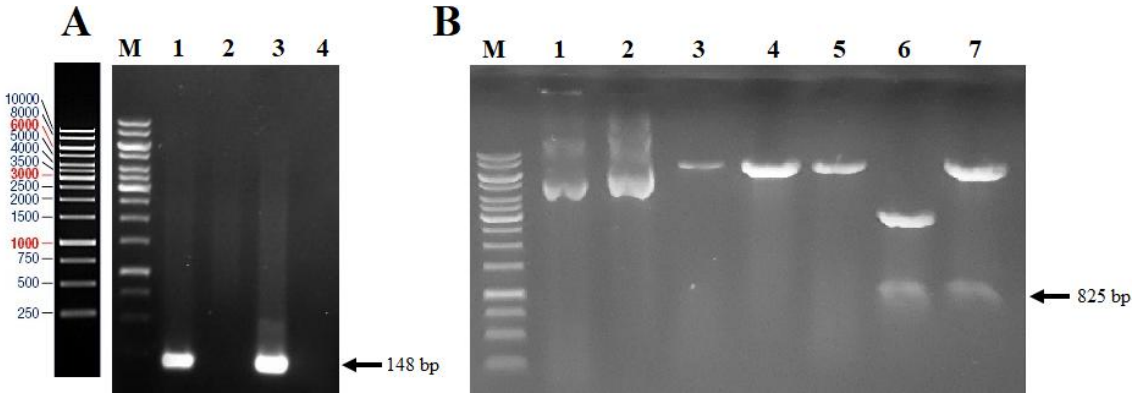
نوترکیب، یک برچسب هیستیدینی شامل ۶ اسیدآمینه متوالی هیستیدین در انتهای آمینی پروتئین تعبیه شد. برای جداسازی این برچسب هیستیدینی پس از خالص‌سازی یک جایگاه برش پروتئازی TEV بین برچسب هیستیدینی و توالی رمزکننده پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی قرار گرفت. برای دستیابی به بالاترین سطح بیان در کلروپلاست توتون ژن آلفا-لاکتالبومین تحت راه‌انداز *rrn* توتون (*Prrn*) و توالی 5′ UTR بهینه‌سازی شده ژن ۱۰ فاژ T۷ (*T7g10*)، شامل توالی افزاینده TTAACTTTA تحت عنوان موتیف اپسیلون که باعث افزایش تمایل اتصال mRNA به 16S rRNA می‌شود، توالی ۱۰ نوکلئوتیدی فاصله دهنده پلی A بین موتیف اپسیلون و جایگاه اتصال ریبوزوم که باعث بهبود میزان ترجمه شده و توالی TAAGGAGTG به عنوان جایگاه اتصال ریبوزوم (RBS) بیان شد (Takahashi *et al*., 2013). از توالی پایان‌دهنده اپرون *rrn*B باکتری *E. coli* نیز در پایین دست توالی رمز کننده پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی استفاده شد (شکل ۱، B). این عناصر تنظیمی می‌توانند تضمین کننده بیان بالای پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی در کلروپلاست توتون باشند.



شکل ۱. نقشه فیزیکی ناحیه نوترکیبی A) پلاسمید پایه pPRV111A و B) پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA. rps7/12: توالی رمز کننده پروتئین ریبوزومی S12/7، Nt-Prrn: توالی راه‌انداز ژن *rrn* توتون، 5′UTR T7g10: ناحیه غیرترجمه شونده ۵′ ژن ۱۰ فاژ T۷، 6xHis: توالی برچسب هیستیدینی، TEV site: جایگاه برش پروتئازی TEV، hLA: توالی رمز کننده ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی، rrnB: توالی خاتمه دهنده ژن *rrnB* از باکتری *E. coli*، PpsbA: توالی راه‌انداز ژن *psbA*، aadA: توالی رمزکننده ژن *aadA* اعطا کننده مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین، TpsbA: توالی خاتمه دهنده ژن *psbA*، rrn16: توالی رمزکننده RNA ریبوزومی 16S پلاستیدی، P1 تا P5: مکان اتصال آغازگرهای اختصاصی ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی را نشان می‌دهد

Figure 1. Physical map of the recombinant region in the chloroplast genome: A) Backbone plasmid pPRV111A and B) Recombinant plasmid pPRV-hLA. rps7/12: ribosomal protein S12/7 coding sequence; Nt-Prrn: promoter of tobacco *rrn* gene; 5′UTR T7g10: 5′ untranslated region of T7 phage gene 10; 6xHis: His-tag sequence; TEV site: TEV protease cleavage site; hLA: coding sequence of human α-lactalbumin gene; rrnB: terminator sequences from *E. coli rrnB* gene; PpsbA: promoter of *psbA* gene; aadA: coding sequence for spectinomycin/streptomycin resistance; TpsbA: terminator of *psbA* gene; rrn16: chloroplast 16S ribosomal RNA coding sequence; P1 to P5: binding sites of primers specific to the human α-lactalbumin gene

تأیید مولکولی پلاسمید نوترکیب: پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA پس از استخراج از باکتری رشد یافته در محیط گزینشی، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آنزیم‌های محدودکننده تأیید شد. در آنالیز PCR، یک باند به اندازه ۱۴۸ جفت‌باز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی مشاهده شد که هم‌اندازه با باند حاصل از شاهد مثبت (pUC57-hLA) بود و در شاهد منفی (pPRV111A و واکنش بدون DNA) دیده نشد (شکل ۲، A). برش آنزیمی تک‌گانه با *Xho*I منجر به خطی شدن ناقل‌ها شد و اندازه بزرگ‌تر pPRV-hLA نسبت به ناقل پایه، درج ژن هدف را تأیید کرد. برش دوگانه با *Hind*III و *Pst*I، قطعه‌ای ۸۱۵ جفت‌باز از pPRV-hLA آزاد کرد که با قطعه موجود در ناقل اولیه pUC57-hLA هم‌اندازه بود، اما از ناقل پایه چنین قطعه‌ای خارج نشد (شکل ۲، B).

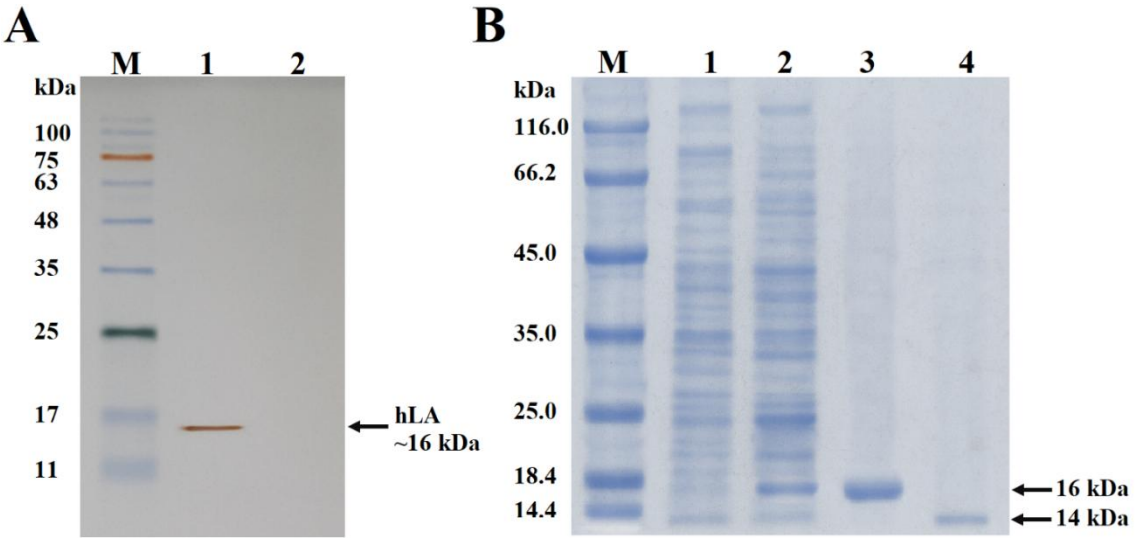


شکل ۲. A) آنالیز PCR جهت تأیید حضور ژن آلفا-لاکتالبومین انسانی در پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA. M: نشانگر وزن مولکولی (1 kb DNA Ladder، Fermentas)؛ ۱: پلاسمید pUC57-hLA به‌عنوان شاهد مثبت؛ ۲: پلاسمید pPRV111A به‌عنوان شاهد منفی؛ ۳: پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA؛ ٤: واکنش بدون DNAالگو به‌عنوان شاهد منفی. پیکان، باند تکثیر شده مورد انتظار (۱٤۸ جفت باز) را نشان می‌دهد. B) آنالیز هضم آنزیمی جهت تأیید صحت ساختار پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA. M: نشانگر وزن مولکولی (1 kb DNA Ladder، Fermentas)؛ ۱: پلاسمید pPRV111A بدون هضم آنزیمی؛ ۲: پلاسمید نوترکیب pPRV-hLAبدون هضم؛ ۳: برش پلاسمید pPRV111A با آنزیم *Xho*I؛ ٤: برش پلاسمید نوترکیب pPRV-hLAبا *Xho*I؛ ٥: برش پلاسمید pPRV111A با آنزیم‌های *Hind*III و *Pst*I؛ ٦: برش پلاسمید pUC57-hLAبا *Hind*III و *Pst*I؛ ۷: برش پلاسمید نوترکیب pPRV-hLA با *Hind*III و *Pst*I

Figure 2. A) PCR analysis to confirm the presence of the human α-lactalbumin gene in the recombinant plasmid pPRV-hLA. M: Molecular weight marker (1 kb DNA Ladder, Fermentas); 1: pUC57-hLA plasmid as positive control; 2: pPRV111A plasmid as negative control; 3: recombinant plasmid pPRV-hLA; 4: no-template control (negative control). The arrow indicates the expected amplified fragment of 148 bp. B) Restriction enzyme digestion analysis to verify the structure of the recombinant plasmid pPRV-hLA. M: Molecular weight marker (1 kb DNA Ladder, Fermentas); 1: undigested pPRV111A plasmid; 2: undigested recombinant pPRV-hLA plasmid; 3: digestion of pPRV111A with *Xho*I; 4: digestion of recombinant pPRV-hLA with *Xho*I; 5: digestion of pPRV111A with *Hind*III and *Pst*I; 6: digestion of pUC57-hLA with *Hind*III and *Pst*I; 7: digestion of recombinant pPRV-hLA with *Hind*III and *Pst*I

بیان پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی در باکتری *E. coli*: کاست بیانی نوترکیب برای بررسی عملکرد ترجمه‌ای، در باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) بیان شد. نتایج آنالیز لکه‌گذاری وسترن نشان داد که پروتئین هدف با وزن تقریبی ۱۶ کیلو دالتون در سلول‌های نوترکیب بیان شده است، در حالی که در نمونه شاهد (باکتری غیرنوترکیب) هیچ باندی در این ناحیه مشاهده نشد (شکل ۳، A).

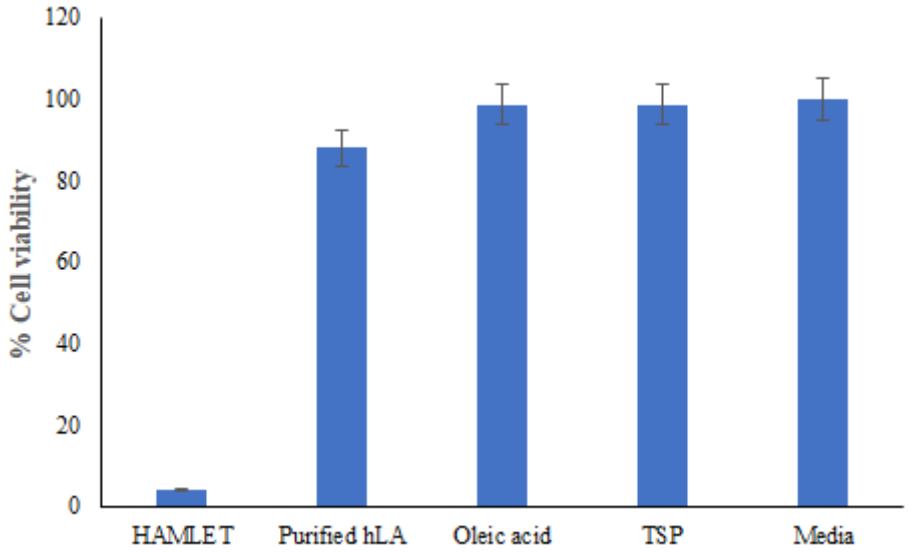
تخلیص پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی: پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی بیان‌شده به‌صورت محلول از سلول‌های باکتری استخراج و به‌کمک کروماتوگرافی تمایلی مبتنی بر رزین نیکل خالص‌سازی شد. آنالیز SDS-PAGE نشان داد که پروتئین خالص‌شده دارای باند مشخصی در حدود ۱۶ کیلو دالتون بود. پس از حذف برچسب هیستیدینی با آنزیم TEV، اندازه باند به حدود ۱۴ کیلو دالتون کاهش یافت که با وزن نظری پروتئین بدون برچسب مطابقت داشت (شکل ۳، B).



شکل ۳. A) بررسی بیان پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی در *E. coli* با استفاده از آنالیز وسترن بلات تحت شرایط احیایی. M: نشانگر پروتئینی رنگ‌آمیزی‌شده (Prestained Protein Ladder، کد PR911654 ، شرکت سیناکلون)؛ ۱: پروتئین محلول کل باکتری نوترکیب؛ ۲: پروتئین محلول کل باکتری غیر نوترکیب. نوار مشاهده‌شده در حدود ۱۶ کیلو دالتون بیان آلفا-لاکتالبومین انسانی را نشان می‌دهد. B) خالص‌سازی پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی بیان‌شده در *E. coli*. M: نشانگر پروتئینی؛ ۱: پروتئین محلول کل باکتری غیرنوترکیب؛ ۲: پروتئین محلول کل باکتری نوترکیب؛ ۳: پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی خالص‌شده حاوی برچسب هیستیدینی (~16 kDa)؛ ٤: پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی پس از حذف برچسب هیستیدینی (~14 kDa)

Figure 3. A) Expression analysis of human α-lactalbumin in *E. coli* using Western blot under reducing conditions. M: Prestained Protein Ladder (PR911654, Sinaclon); 1: total soluble protein from recombinant *E. coli*; 2: total soluble protein from non-recombinant *E. coli*. The band around 16 kDa corresponds to the expressed human α-lactalbumin. B) Purification of human α-lactalbumin expressed in *E. coli*. M: Protein marker; 1: total soluble protein from *E. coli*; 2: total soluble protein from recombinant *E. coli*; 3: purified His-tagged human α-lactalbumin (~16 kDa); 4: purified human α-lactalbumin after His-tag removal (~14 kDa)

ارزیابی زیســت‌فعالی مجموعه HAMLET: به‌منظور بررســی اثر زیســتی مجموعه HAMLET، این ترکیب از پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسـانی خالص‌شـده و اسـید اولئیک تهیه گردید و اثر آن بر روی رده سـلولی سـرطان کولورکتال انسـانی WiDr ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نتایج حاصل از آزمون MTT بیانگر کاهش قابل‌توجه زنده‌مانی سـلول‌ها در اثر تیمار با مجموعه HAMLET بود. به‌طور مشـخص، تیمار سـلول‌ها با غلظت ۲۱ میکرومولار HAMLET باعث کاهش حدود ۹۶ درصـدی بقاء سـلولی گردید. در مقابل، تیمار سـلول‌ها با پروتئین آلفا-لاکتالبومین خالص‌شـده یا اسـید اولئیک به‌تنهایی، اثر قابل‌توجهی بر زنده‌مانی سلول‌ها نداشت و درصد بقاء در این تیمارها نزدیک به گروه کنترل باقی ماند. همچنین تیمار با پروتئین کل استخراج‌شده از باکتری غیرنوترکیب نیز تغییری در بقاء سلولی ایجاد نکرد. این تفاوت آشکار در پاسخ سلولی نشان می‌دهد که ویژگی سـایتوتوکسـیک مشـاهده‌شـده تنها در حضـور هم‌زمان دو جزء پروتئینی و اسـید چرب در قالب مجموعه HAMLET ایجاد می‌شود و هیچ‌یک از اجزاء به‌تنهایی قادر به القای مرگ سلولی مؤثر نیستند.



شـکل ٤. ارزیابی بقای سـلول‌های سـرطانی WiDr پس از ٦ سـاعت تیمار با ترکیبات مختلف شـامل: ۲۱ میکرومولار مجموعه HAMLET، ۲۱ میکرومولار پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسـانی (hLA) خالص‌شـده از باکتری، ۲/۵ میلی‌مولار اسـید اولئیک، پروتئین محلول کل (TSP) اسـتخراج‌شـده از باکتری غیر نوترکیب، و محیط کشت (کنترل). آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. میله‌های خطا بیانگر انحراف معیار از میانگین هستند

Figure 4. Assessment of WiDr cell viability after 6 hours of treatment with 21 µM HAMLET complex, 21 µM purified human α-lactalbumin (hLA) from *E. coli*, 2.5 mM oleic acid, total soluble protein (TSP) from non-recombinant *E. coli*, and culture medium (control). Experiments were performed in triplicate, and results are presented as mean ± standard deviation

بحث

در این مطالعه، عملکرد یک کاست بیانی کلروپلاستی بهینه‌شده برای تولید پروتئین آلفا-لاکتالبومین انسانی در سیستم پروکاریوتی *E. coli* ارزیابی شد. هدف از این مطالعه، فراهم‌سازی یک الگوی طراحی برای انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان با توجه به شباهت قابل‌توجه بین سامانه‌های رونویسی و ترجمه‌ای کلروپلاست‌ها و باکتری‌ها بود (Khan, 2012; Maliga & Bock, 2011). نتایج حاصل نشان داد که ترکیب عناصر تنظیمی قوی شامل راه‌انداز *rrn* توتون، ناحیه 5´ UTR بهینه‌سازی‌شده ژن ۱۰ فاژ T7 و پایان‌دهنده *rrnB* باکتری، منجر به بیان موفق، پایدار و محلول پروتئین هدف گردید. این یافته‌ها اثبات می‌کنند که طراحی انجام‌شده از نظر عملکردی مؤثر بوده و قابلیت انتقال به سامانه‌ی کلروپلاستی را دارد. خالص‌سازی موفق پروتئین، حذف دقیق برچسب هیستیدینی توسط آنزیم TEV و حفظ ویژگی زیستی آن پس از تشکیل کمپلکس HAMLET، بیانگر صحت تاخوردگی و پایداری ساختاری پروتئین است. بررسی‌های زیستی نشان دادند که کمپلکس HAMLET حاصل از آلفا-لاکتالبومین تولیدی در *E. coli* موجب کاهش ۹۶ درصدی بقاء سلول‌های سرطانی WiDr گردید. در حالی‌که اجزاء منفرد پروتئین یا اسید اولئیک چنین اثری نداشتند. این نتایج با مطالعات پیشین درباره فعالیت انتخابی HAMLET بر سلول‌های توموری مطابقت دارد (Hakansson et al., 2011). پروتئین‌های وی شیر، از جمله آلفا-لاکتالبومین و بتا-لاکتوگلوبولین، به دلیل نقش تغذیه‌ای و زیستی گسترده، از اهداف اصلی تحقیقات مهندسی بیان به شمار می‌روند (Kalidas et al., 2001; Saito et al., 2002; Totsuka et al., 1990). تلاش‌های اولیه برای تولید این پروتئین‌ها عمدتاً در سامانه‌های یوکاریوتی مانند مخمر و سلول‌های پستانداران انجام شد تا امکان ترشح پروتئین‌های با تاخوردگی صحیح و محلول فراهم شود (Demain & Vaishnav, 2009). با این حال، در میزبان‌های مخمر معمولاً تغییرات پساترجمه‌ای ناخواسته از جمله گلیکوزیلاسیون‌های غیرطبیعی مشاهده می‌شود که می‌تواند بر عملکرد زیستی پروتئین‌ها تأثیر منفی بگذارد (Bijl et al., 2020). پیشرفت‌های اخیر در استفاده از *Komagataella phaffii* سبب دستیابی به سطوح بیانی بالا برای آلفا-لاکتالبومین انسانی شده است؛ به طوری که با استفاده از پپتید نشانه فاکتور α، تولید نهایی این پروتئین به ۵۶/۳ میلی‌گرم در لیتر رسید که بالاترین میزان گزارش‌شده برای بیان ترشحی این پروتئین تاکنون است (Deng et al., 2022). در دهه‌های اخیر، بیان پروتئین‌های شیر در گیاهان تراریخته نیز به عنوان رویکردی نویدبخش برای تولید ایمن، ارزان و پایدار این ترکیبات مطرح شده است. مطالعات متعددی بیان موفق پروتئین‌های نوترکیب شیر انسان را در گیاهان مختلف گزارش کرده‌اند. از جمله، آلفا-لاکتالبومین در توتون (Takase & Hagiwara, 1998) و ذرت (Yang et al., 2002)، بتا-کازئین در سیب‌زمینی (Chong et al., 1997) و سویا (Philip et al., 2001) و لاکتوفرین در برنج (Nandi et al., 2002; Suzuki et al., 2003) و توتون (Choi et al., 2003) تولید شده‌اند. در مطالعه Takase و Hagiwara (۱۹۹۸)، آلفا-لاکتالبومین انسانی تحت کنترل راه‌انداز 35S ویروس موزایک کلم به صورت محلول و دارای فعالیت زیستی کامل بیان شد. در ذرت نیز بیان این پروتئین تحت کنترل راه‌انداز ubi-1 منجر به تجمع پروتئین عملکردی در آندوسپرم با غلظتی بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ گرم در هر ۱۰۰ گرم دانه گردید (Bicar et al., 2008;

Yang et al., 2002). این نتایج به روشنی نشان می‌دهند که سیستم‌های گیاهی توانایی تولید پروتئین‌های عملکردی شیر انسان را دارند، اگرچه سطح تجمع آن‌ها هنوز پایین‌تر از مقادیر صنعتی است. بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه بیان پروتئین‌های شیر در بازه زمانی ۱۰ تا ۳۰ سال گذشته انجام شده و در آن زمان عمدتاً با هدف بررسی‌های بنیادی و اثبات امکان‌پذیری علمی صورت گرفته‌اند، نه تولید تجاری یا غذایی. اما در سال‌های اخیر، با پیشرفت فناوری‌های بیان هتروولوگ، کاهش هزینه‌های تخمیر و خالص‌سازی، و افزایش حساسیت عمومی به پایداری زیست‌محیطی، رویکردهای زیست‌فناورانه برای تولید پروتئین‌های شیر توجه ویژه‌ای یافته‌اند. استارتاپ‌هایی نظیر Perfect Day، New Culture، Formo، The Vegan Cowboys و Pigment از پیشگامان این حوزه هستند. در میان آن‌ها، تنها Perfect Day تاکنون موفق به دریافت تأییدیه نظارتی برای پروتئین وی شده و محصولاتش وارد بازار شده‌اند. اطلاعات منتشرشده از این شرکت‌ها و ثبت اختراعات مربوطه نشان می‌دهد که تمرکز عمده آن‌ها بر سنتز کازئین‌ها و پروتئین‌های وی انسانی با استفاده از میزبان‌های مختلف، به‌ویژه مخمرها و قارچ‌ها، است (Gibson et al., 2022). این تحولات صنعتی، بیانگر گذار از پژوهش‌های آزمایشگاهی به تولید واقعی غذاهای بدون منشأ حیوانی است. از دیدگاه زیست‌فناوری، استفاده از سیستم‌های کلروپلاستی برای تولید پروتئین‌های شیر انسانی، به‌ویژه آلفا–لاکتالبومین، به دلیل ظرفیت بالای بیان، ایمنی زیستی، هزینه پایین تولید و عدم نیاز به تجهیزات تخمیری پیچیده، گزینه‌ای بسیار مناسب محسوب می‌شود (Adem et al., 2017; Maliga & Bock, 2011). بیان موفق این پروتئین در سیستم باکتریایی تأییدی بر قابلیت طراحی کاست است و می‌تواند گامی مقدماتی برای انتقال مؤثر آن به گیاه میزبان باشد. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که کاست بیانی طراحی‌شده از نظر رونویسی و ترجمه‌ای کارآمد بوده و پروتئین حاصل، از لحاظ ساختاری و عملکردی، کیفیت مطلوبی دارد. با توجه به این یافته‌ها، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، ارزیابی‌های تکمیلی شامل بیان واقعی در کلروپلاست توتون، تعیین سطح تجمع پروتئین، پایداری، بررسی صحت تاخوردگی، ارزیابی دز–پاسخ و گسترش آزمون‌های زیستی در رده‌های سلولی متنوع انجام گیرد. اجرای این آزمایش‌ها می‌تواند مسیر توسعه سامانه‌های کلروپلاستی به عنوان پلتفرم تولید صنعتی پروتئین‌های عملکردی انسانی را هموار سازد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش، با طراحی یک کاست بیانی کلروپلاستی بهینه‌شده حاوی ژن آلفا–لاکتالبومین انسانی و استفاده از عناصر تنظیمی مؤثر شامل راه‌انداز rrn، توالی 5′ UTR ژن ۱۰ فاژ T۷ و توالی پایان‌دهنده rrnB، بیان موفق این پروتئین در سیستم باکتریایی *E. coli* به‌عنوان میزبان اولیه بررسی شد. نتایج آنالیز لکه‌گذاری وسترن و SDS-PAGE تأیید کننده بیان مؤثر پروتئین با وزن صحیح و قابلیت خالص‌سازی آن از طریق کروماتوگرافی تمایلی بود. پس از جداسازی برچسب هیستیدینی، پروتئین آلفا–لاکتالبومین انسانی با اسید اولئیک ترکیب و مجموعه HAMLET تولید گردید که در آزمون زیست‌سنجی MTT، کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی WiDr تا سطح ۹۶ درصد را نشان داد. این نتایج بیانگر فعالیت زیستی مناسب و پتانسیل بالای کاربرد درمانی آلفا–لاکتالبومین نوترکیب تولید شده است. با توجه به شباهت عملکردی میان سیستم‌های پروکاریوتی و کلروپلاست، می‌توان انتظار داشت که کاست بیانی طراحی‌شده در کلروپلاست گیاه توتون نیز منجر به

بیان مؤثر این پروتئین گردد. بدین‌ترتیب، این تحقیق پایه‌ای برای توسعه راهکارهای زیست‌فناورانه در جهت تولید صنعتی پروتئین‌های شیر انسانی در گیاهان و بهره‌برداری غذایی و درمانی از آن‌ها فراهم می‌سازد. به‌ویژه، تولید گیاهی مجموعه‌های زیست‌فعالی مانند HAMLET می‌تواند در آینده جایگزین مقرون‌به‌صرفه‌ای برای تولید داروهای ضدسرطان مبتنی بر پروتئین باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر حمایت مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Adem, M., Beyene, D., & Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, *13*(1), 30. https://doi.org/10.1186/s13007-017-0179-1

Bicar, E. H., Woodman-Clikeman, W., Sangtong, V., Peterson, J. M., Yang, S. S., Lee, M., & Scott, M. P. (2008). Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. *Transgenic Research*, *17*, 59-71. https://doi.org/10.1007/s11248-007-9081-3

Bijl, E., Holland, J. W., & Boland, M. (2020). Posttranslational modifications of caseins. In *Milk proteins* (pp. 173-211). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00005-0

Bimboim, H., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513-1523. https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chetta, K. E., Alcorn, J. L., Baatz, J. E., & Wagner, C. L. (2021). Cytotoxic lactalbumin-oleic acid complexes in the human milk diet of preterm infants. *Nutrients*, *13*(12), 4336. https://doi.org/10.3390/nu13124336

Choi, S.-M., Lee, O.-S., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S., Yu, D.-Y., & Lee, H.-S. (2003). High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnology Letters*, *25*, 213-218. https://doi.org/10.1023/A:1022341917735

Chong, D., Roberts, W., Arakawa, T., Illes, K., Bagi, G., Slattery, C., & Langridge, W. (1997). Expression of the human milk protein β-casein in transgenic potato plants. *Transgenic Research*, *6*, 289-296. https://doi.org/10.1023/A:1018410712288

Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D., Monforti-Ferrario, F., Tubiello, F. N., & Leip, A. (2021). Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions. *Nature Food*, *2*(3), 198-209. https://doi.org/10.1038/s43016-021-00225-9

Daniell, H., Ruiz, G., Denes, B., Sandberg, L., & Langridge, W. (2009). Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnology*, *9*(1), 1-16. https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-33

Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., & Streatfield, S. J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science*, *14*(12), 669-679. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.009

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, *27*(3), 297-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

Deng, M., Lv, X., Liu, L., Li, J., Du, G., Chen, J., & Liu, Y. (2022). Efficient Bioproduction of Human Milk Alpha-Lactalbumin in Komagataella phaffii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(8), 2664-2672. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07908

Desbrow, B., Burd, N. A., Tarnopolsky, M., Moore, D. R., & Elliott-Sale, K. J. (2019). Nutrition for special populations: young, female, and masters athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, *29*(2), 220-227. https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0269

Gibson, M., Radman, I., & Abo, A. (2022). Cheese and yogurt like compositions and related methods. In: Google Patents.

Hakansson, A. P., Roche-Hakansson, H., Mossberg, A.-K., & Svanborg, C. (2011). Apoptosis-like death in bacteria induced by HAMLET, a human milk lipid-protein complex. *PloS One*, *6*(3), e17717. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017717

Kalidas, C., Joshi, L., & Batt, C. (2001). Characterization of glycosylated variants of β-lactoglobulin expressed in Pichia pastoris. *Protein Engineering*, *14*(3), 201-207. https://doi.org/10.1093/protein/14.3.201

Kamijima, T., Ohmura, A., Sato, T., Akimoto, K., Itabashi, M., Mizuguchi, M., Kamiya, M., Kikukawa, T., Aizawa, T., & Takahashi, M. (2008). Heat-treatment method for producing fatty acid-bound alpha-lactalbumin that induces tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *376*(1), 211-214. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.127

Khan, M. S. (2012). Plastid genome engineering in plants: present status and future trends. *Molecular Plant Breeding*, *3*(9). https://doi.org/10.5376/MPB.2012.03.0009

Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics*, *63*(8), 301. https://doi.org/10.3345/cep.2020.00311

Kwon, K. C., Nityanandam, R., New, J. S., & Daniell, H. (2013). Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC 6 cells. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(1), 77-86. https://doi.org/10.1111/pbi.12008

Laemmli, U. (1979). Slab gel electrophoresis: SDS–PAGE with discontinuous buffers. *Nature*, *227*, 680-685.

Layman, D. K., Lönnerdal, B., & Fernstrom, J. D. (2018). Applications for α-lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, *76*(6), 444-460. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004

Maliga, P., & Bock, R. (2011). Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiology*, *155*(4), 1501-1510. https://doi.org/10.1104/pp.110.170969

Miller, V., Reedy, J., Cudhea, F., Zhang, J., Shi, P., Erndt-Marino, J., Coates, J., Micha, R., Webb, P., & Mozaffarian, D. (2022). Global, regional, and national consumption of animal-source foods between 1990 and 2018: findings from the Global Dietary Database. *The Lancet Planetary Health*, *6*(3), e243-e256. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00352-1

Park, Y. W., & Haenlein, G. F. W. (Eds.). (2013). Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. *John Wiley & Sons*, https://doi.org/10.1002/9781118534168

Nandi, S., Suzuki, Y. A., Huang, J., Yalda, D., Pham, P., Wu, L., Bartley, G., Huang, N., & Lönnerdal, B. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science*, *163*(4), 713-722. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00165-6

Permyakov, E. A. (2020). α-Lactalbumin, amazing calcium-binding protein. *Biomolecules*, *10*(9), 1210. https://doi.org/10.3390/biom10091210

Philip, R., Darnowski, D. W., Maughan, P. J., & Vodkin, L. O. (2001). Processing and localization of bovine β-casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. *Plant Science*, *161*(2), 323-335. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00420-4

Qamar, S., Manrique, Y. J., Parekh, H., & Falconer, J. R. (2020). Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical*

Reviews in Food Science and Nutrition, *60*(16), 2742-2762. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1657062

Sadovnikova, A., Garcia, S. C., & Hovey, R. C. (2021). A comparative review of the cell biology, biochemistry, and genetics of lactose synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *26*(2), 181-196. https://doi.org/10.1007/s10911-021-09490-7

Saito, A., Usui, M., Song, Y., Azakami, H., & Kato, A. (2002). Secretion of glycosylated α-lactalbumin in yeast Pichia pastoris. *The Journal of Biochemistry*, *132*(1), 77-82. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003202

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition. In: Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York. https://doi.org/10.1002/abio.370050118

Séverin, S., & Wenshui, X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(7-8), 645-656. https://doi.org/10.1080/10408690490911756

Springmann, M., Wiebe, K., Mason-D'Croz, D., Sulser, T. B., Rayner, M., & Scarborough, P. (2018). Health and nutritional aspects of sustainable diet strategies and their association with environmental impacts: a global modelling analysis with country-level detail. *The Lancet Planetary Health*, *2*(10), e451-e461. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30206-7

Suzuki, Y. A., Kelleher, S. L., Yalda, D., Wu, L., Huang, J., Huang, N., & Lönnerdal, B. (2003). Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *36*(2), 190-199. https://doi.org/10.1002/j.1536-4801.2003.tb07989.x

Takahashi, S., Furusawa, H., Ueda, T., & Okahata, Y. (2013). Translation enhancer improves the ribosome liberation from translation initiation. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(35), 13096-13106. https://doi.org/10.1021/ja405967h

Takase, K., & Hagiwara, K. (1998). Expression of human α-lactalbumin in transgenic tobacco. *The Journal of Biochemistry*, *123*(3), 440-444. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021956

Totsuka, M., Katakura, Y., Shimizu, M., Kumagai, I., Miura, K.-i., & Kaminogawa, S. (1990). Expression and secretion of bovine β-lactoglobulin in Saccharomyces cerevisiae. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(12), 3111-3116. https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870482

Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L. J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J. A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., Afshin, A., Chaudhary, A., Herrero, M., Agustina, R., Branca, F., Lartey, A., Fan, S., Crona, B., Fox, E., Bignet, V., Troell, M., Lindahl, T., Singh, S., Cornell, S. E., Srinath Reddy, K., Narain, S., Nishtar, S., & Murray, C. J. L. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, *393*(10170), 447-492. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4

Yang, S.-H., Moran, D. L., Jia, H.-W., Bicar, E. H., Lee, M., & Scott, M. P. (2002). Expression of a synthetic porcine α-lactalbumin gene in the kernels of transgenic maize. *Transgenic Research*, *11*, 11-20. https://doi.org/10.1023/A:1013996129125

Zoubenko, O. V., Allison, L. A., Svab, Z., & Maliga, P. (1994). Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Research*, *22*(19), 3819-3824. https://doi.org/10.1093/nar/22.19.3819