Bicistronic and Stable Expression of Human Coagulation Factor IX and Enhanced Green Fluorescent Protein in Suspension-Adapted Chinese Hamster Ovary Cells

Fahimeh Ghasemi[1,2], Fatemeh Nikumanesh[3], Alireza Zomorodipour[4]

1. Assistant professor, Cell and molecular research center, Birjand university of medical sciences, Birjand, Iran, ORCID ID: 0000-0002-5870-3396

2. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.ORCID ID: 0000-0002-5870-3396

3. Assistant professor,*Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran*. ORCID ID: 0000-0002-2097-7973

4. Professor, Department of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB),Tehran, Iran. (Corresponding author), Tel: +98 21 44787348, Email: zomorodi@nigeb.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-0671-4779

ABSTRACT

Background and Aim: The current treatment for hemophilia B is replacement therapy, which involves the intravenous infusion of human coagulation factor IX (hFIX) purified from plasma or a recombinant form produced in mammalian cells. In this study, using a bicistronic expression system, the stable expression of the hFIX in a serum-free and suspension-adapted Chinese hamster ovary cell line (CHO-s) was investigated.

Materials and Methods: A DNA fragment consisting of hFIX, Internal Ribosome Entry Site (IRES) and Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) nucleotide sequences was cloned into pcDNA3.1 expression plasmid under the control of Cytomegalovirus (CMV) promoter. The bicistronic plasmid was then linearized using *Bgl*II restriction enzyme and transfected into CHO-s cells. The transfected cells were treated with geneticin for 14 days. The culture medium of the stable cells was then collected and the expression level of the hFIX were examined using western blotting and ELISA. The coagulation activity was also evaluated by the chromogenic method.

Results: The recombinant CHO-s cells resistant to geneticin were observed under a fluorescence microscope in green color, which indicated the expression and accumulation of the EGFP in the cytoplasm of the cells. The results of Western blotting confirmed the expression and secretion of the hFIX into the culture medium. The amount of the secreted hFIX was 150 ng/mL/10^6cells with a coagulation activity of 5.6 ±0.2 mU/mL.

Conclusion: Our findings demonstrated that this bicistronic expression system could simultaneously produce EGFP and hFIX in CHO-s cells. This expression system facilitates selection and isolation of hFIX-expressing cells.

Key words: Human coagulation factor IX, Chinese hamster ovary cell, Enhanced green fluorescent protein, Bicistronic expression.

Received: Oct 1, 2020 **Accepted:** Dec 28, 2021

How to cite the article: Fahimeh Ghasemi, Fatemeh Nikumanesh, Alireza Zomorodipour. Bicistronic and Stable Expression of Human Coagulation Factor IX and Enhanced Green Fluorescent Protein in Suspension-Adapted Chinese Hamster Ovary Cells .ŚJKU 2023;28(2):12-27.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

بیان دو سیسترونی و پایدار فاکتور ۹ انعقادی انسانی و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در سلول‌های تخمدان همستر چینی سازگار با کشت معلق

فهیمه قاسمی[۱،۲]، فاطمه نیکومنش[۳]، علیرضا زمردی پور[۴]

۱. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. کد ارکید: ۳۳۹۶-۵۸۷۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. گروه زیست فناوری پزشکی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران، کد ارکید: ۳۳۹۶-۵۸۷۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران، کد ارکید: ۷۹۷۳-۲۰۹۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. استاد، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: zomorodi@nigeb.ac.ir تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۴۸، کد ارکید: ۴۷۷۹-۰۶۷۱-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: درمان فعلی هموفیلی B درمان جایگزینی است که شامل تزریق داخل وریدی فاکتور ۹ انسانی خالص شده از پلاسما یا فرم نوترکیب تولید شده در سلول‌های پستانداران است. در تحقیق حاضر با استفاده از یک سیستم بیانی دو سیسترونی، بیان پایدار فاکتور ۹ انسانی در ردهٔ سلولی تخمدان همستر چینی سازگار با کشت معلق (CHO-s) و محیط عاری از سرم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: یک قطعه DNA متشکل از توالی های نوکلئوتیدی فاکتور ۹ انسانی، جایگاه میانی ورود ریبوزوم و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در وکتور بیانی pcDNA3.1 تحت کنترل پروموتر سایتومگالو ویروس همسانه سازی شد. پلاسمید دوسیسترونی حاصل با استفاده از آنزیم برشگر *Bgl*II خطی و در سلول‌های CHO-s ترانسفکت شد. سلول‌های ترنسفکت شده به مدت ۱۴ روز تحت تیمار با ماده جنتیسین قرار گرفتند. سپس محیط کشت سلول‌های پایدار جمع‌آوری و بیان فاکتور ۹ با استفاده از وسترن بلاتینگ و الایزا بررسی شد. فعالیت انعقادی نیز با روش کروموژنیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های CHO-s نوترکیب و مقاوم به جنتیسین، زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز مشاهده شدند که حاکی از بیان و تجمع پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده در سیتوپلاسم سلول‌ها بود. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ، بیان و ترشح فاکتور ۹ نوترکیب به داخل محیط کشت را تائید کرد. مقدار فاکتور ۹ ترشح شده ۱۵۰ $ng/mL/10^6$ و فعالیت انعقادی آن ۰/۲ ± ۵/۶ mU/mL محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: یافته های ما نشان داد که این سیستم بیانی دو سیسترونی توانایی تولید هم‌زمان پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده و فاکتور ۹ انسانی را در سلول‌های CHO-s دارد. این سامانه بیانی، فرایند انتخاب و جداسازی سلول‌های بیان کننده فاکتور ۹ را تسهیل می‌کند.

کلمات کلیدی: فاکتور ۹ انعقادی انسانی، سلول تخمدان همستر چینی، پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده، بیان دوسیسترونی.

وصول مقاله: ۹۹/۷/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۰/۹/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۷

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

مقدمه

هموفیلی B اولین بار در سال ۱۹۵۲ در فردی بنام استفان کریسمس شناسایی و از آن پس با نام بیماری کریسمس نیز نام‌گذاری شد و بدین طریق از نوع شایع‌تر هموفیلی (هموفیلی A) متمایز گردید (۱). هموفیلی B نوعی اختلال انعقادی است که در اثر کاهش سطح فاکتور ۹ انعقادی فعال در خون بروز می‌کند. این بیماری به صورت مغلوب و وابسته به کروموزوم X به ارث می‌رسد؛ بنابراین زنان کمتر به این بیماری مبتلا می شوند(۲-۴). هموفیلی B دومین نوع شایع هموفیلی (پس از هموفیلی A) است و تخمین زده شده است که از هر ۳۰۰۰۰ تولد زنده مذکر یک نفر به این بیماری مبتلا می‌شود (۴-۶). این بیماری همه نژادها را به طور یکسان تحت تأثیر قرار می‌دهد و اولویت نژادی ندارد (۷). درمان اختصاصی و اصلی هموفیلی B، از طریق درمان جایگزینی انجام می شود که شامل تزریق فاکتور ۹ در زمان خونریزی (درمان بر حسب تقاضا) و یا تزریق دوره‌ای مثلاً چندین بار در هفته (درمان پیشگیرانه) است(۹ و ۸ و ۵). درمان پیشگیرانه یک روش استاندارد برای درمان بیماران مبتلا به نوع حاد هموفیلی B است. از زمان معرفی فاکتور ۹ انعقادی مشتق از پلاسما در سال ۱۹۹۲، کیفیت و همچنین امید به زندگی این بیماران به طور چشمگیری افزایش یافته است(۱۰ و ۵). طی ۲۰ سال اخیر با پیشرفت‌های حاصل شده در روش‌های خالص‌سازی پروتئین و همچنین غیرفعالسازی ویروس‌ها، سطح ایمنی محصولات مشتق شده از پلاسما ارتقا یافته است. با این حال همچنان نگرانی‌هایی راجع به انتقال پریون‌ها، ویروس‌ها و عوامل بیماری‌زای نوظهور توسط پروتئین‌های دارویی مشتق از پلاسما وجوددارد (۱۱).

پیش ساز فاکتور ۹ انعقادی از سه بخش عمده تشکیل شده است که شامل پپتید راهنما (پری‌پپتید) با ۲۸ اسید آمینه، پروپپتید با ۱۸ اسید آمینه و فاکتور ۹ بالغ به طول ۴۱۵ اسید آمینه است. فاکتور ۹ انعقادی انسانی در هپاتوسیت های کبدی به صورت پیش‌ساز ساخته می‌شود و قبل از آنکه به داخل خون ترشح شود پپتید راهنما و پروپپتید پردازش شده و حذف می شوند و فاکتور ۹ انعقادی بالغ به صورت زیموژن وارد جریان خون می‌شود (۱۲-۱۷). زیموژن فاکتور ۹ انسانی در جریان خون به‌صورت یک پلی پپتید تک‌رشته‌ای به طول ۴۱۵ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ۵۷ کیلو دالتون در گردش است. فعال شدن فاکتور ۹ انعقادی در دو مرحله رخ می‌دهد که توسط کمپلکس فاکتور بافتی/فاکتور ۷ فعال (TF/FVIIa) یا فاکتور ۱۱ فعال (FXIa) کاتالیز می‌شود (۱۹ و ۱۸).

کلون سازی ژن فاکتور ۹ انعقادی انسانی در سال ۱۹۸۲ تولید فاکتور ۹ انسانی نوترکیب را در سلول‌های تخمدان همستر چینی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک امکان‌پذیر ساخت، به طوری که در سال ۱۹۹۸ نوع نوترکیب فاکتور ۹ انسانی برای اولین بار به صورت تجاری در دسترس قرار گرفت (۵). روش‌های مهندسی ژنتیک امکان تولید فاکتور ۹ انعقادی در محیط کشت عاری از پروتئین های انسانی و حیوانی و در نتیجه عاری از هرگونه عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌کند. از این لحاظ فاکتور ۹ انعقادی نوترکیب جایگاه خوبی را در بین محصولات گوناگون که برای درمان هموفیلی B استفاده می شوند، به دست آورده است. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که در حال حاضر در اسپانیا ۲۸٪ از بیماران هموفیلی B نوع نوترکیب فاکتور ۹ انعقادی و ۶۴٪ از آنان انواع مشتق شده از پلاسما را دریافت می‌کنند (۷ و ۵). در ایران فاکتور ۹ خالص شده از پلاسمای افراد نرمال برای درمان بیماران مبتلا به هموفیلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخلاف هموفیلی A که انواع زیادی از محصولات نوترکیب مجوز سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration, FDA) را دریافت کرده است تا سال ۲۰۱۳ فقط یک محصول نوترکیب از فاکتور ۹ انعقادی با نام تجاری Benefix® (nanocog alpha) برای درمان هموفیلی B در دسترس قرار داشت(۵). در سال ۲۰۱۳ محصول نوترکیب

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

دیگری از فاکتور ۹ با نام تجاری Rixubis برای درمان هموفیلی B تأییدیه FDA را دریافت کرد (۱۳).

رده سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary, CHO) به طور رایج برای تولید بسیاری از گلیکوپروتئین های نوترکیب دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این روش اغلب از سلول‌های CHO DG44 که امکان تکثیر ژن هدف را فراهم می‌کند به عنوان میزبان برای تولید فاکتور ۹ انسانی نوترکیب استفاده شده است. در تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب دارویی در سلول‌های پستانداران از جمله CHO جداسازی یک کلون پایدار بیان‌کننده بسیار پر چالش است. استفاده از یک پروتئین گزارشگر می‌تواند فرایند جداسازی کلون‌های نوترکیب پایدار را با استفاده از روش مرتب سازی سلول فعال شده با فلورسنس (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) تسهیل کند (۲۰).

در مطالعه حاضر هدف ما تولید فاکتور ۹ انعقادی انسانی نوترکیب در سلول‌های CHO-s معلق و سازگار برای رشد در محیط کشت عاری از سرم بوده است. به منظور تسهیل جداسازی کلون های پایدار، از بیان هم‌زمان فاکتور ۹ انعقادی و پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) به عنوان پروتئین گزارشگر استفاده شد. سپس میزان بیان فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت توسط سلول های نوترکیب پایدار مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز برای مراحل کلونینگ:

در این مطالعه سویه Top10 از باکتری اشریشیاکلی (Invitrogen, USA) به عنوان میزبان در مراحل همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از آنزیم های برشگر *Bam*HI، *Bgl*II، *Eco*RI و *Not*I(Thermofisher scientific, USA) و آنزیم T4 لیگاز (Thermofisher scientific, USA) طی مراحل همسانه سازی به منظور برش و اتصال قطعات DNA استفاده شد.

مواد مورد نیاز بخش سلولی:

در مطالعه حاضر از رده سلول‌های CHO-s (Thermofisher scientific, USA) و ماده ترنسفکشن FreeStyl MAX Reagent (Thermofisher scientific, USA) استفاده شد. آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال ضد فاکتور ۹ انعقادی (Abcam, UK) و آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP(Millipore, USA) نیز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب دوسیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ انعقادی و EGFP:

به منظور ساخت پلاسمیدهای نوترکیب دو سیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز ابتدا توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با استفاده از پرایمر hFIX-*Eco*RI، به عنوان پرایمر رفتی و hFIX-*Bam*HI، به عنوان پرایمر برگشتی، تکثیر شد (جدول ۱). پرایمر رفتی در انتهای ۵ خود دارای توالی کزاک و همچنین مجهز به جایگاه برش آنزیمی *Eco*RI بود. در طراحی پرایمر برگشتی hFIX-*Bam*HI، جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI در انتهای ۵' و ۶ کدون اسیدآمینه هیستیدین قبل ازکدون پایان در نظر گرفته شد. قطعه ۱۴۲۵ جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از آنزیم های *Eco*RI و *Bam*HI بریده شده و در جایگاه های مشابه در پلاسمید pIRES2-EGFP همسانه سازی شد. پس از تائید صحت همسانه سازی، توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی به همراه توالی های IRES و EGFP با استفاده از آنزیم های *Eco*RI و *Not*I از پلاسمید فوق خارج شده و در همان جایگاه ها در وکتور بیانی pcDNA3.1 وارد شد. پلاسمید نوترکیب حاصل، با روش‌های PCR (با استفاده از پرایمرهای اختصاصی hFIX)، برش آنزیمی و توالی یابی تائید شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی. زیر جایگاه‌های برش آنزیمی خط کشیده شده است.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (´۵ به سمت ´۳)	جایگاه برش آنزیمی
فوروارد	5´CCGGAATTCGCCACCATGCAGCGCGTG3´	*Eco*RI
ریورس	5´CGCGGATCCTCATTAATGATGATGATGATGATGAGTGAGCTTTGTTTTTTCC3´	*Bam*HI

کشت رده سلول‌های CHO-s:

رده سلول‌های CHO-s به عنوان میزبان برای بیان فاکتور ۹ انسانی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها برای رشد به صورت معلق در محیط کشت تعریف شده، عاری از سرم و پروتئین های انسانی و حیوانی سازگار شده است. سلول‌ها در محیط کشت تعریف شده حاوی L-گلوتامین ۸ میلی مولار کشت داده شدند. در شرایطی که نیاز به جمع‌آوری محیط کشت سلول‌های نوترکیب برای بررسی میزان بیان و فعالیت انعقادی فاکتور ۹ بود، ویتامین K با غلظت نهایی ۵ µg/mL به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها بر روی یک شیکر با سرعت۱۴۰ دور در دقیقه داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. پاساژ سلول‌ها هر ۴۸ ساعت پس از آنکه تراکم سلولی به حدود $۱/۵-۲\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت رسید، انجام شد.

ترانسفکشن سلول‌های CHO-s و ساخت سلول‌های CHO-s بیان کننده فاکتور ۹ انعقادی به صورت پایدار:

به منظور ساخت سلول‌های CHO-s نوترکیب پایدار، ابتدا پلاسمید نوترکیب دوسیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ انعقادی و EGFP با استفاده از آنزیم *Bgl*II(Thermofisher scientific, USA) به صورت خطی در آمد. سپس با استفاده از ماده ترنسفکشن FreeStyl MAX Reagent((Thermofisher scientific, USA) در سلول‌های CHO-s ترانسفکت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های CHO-s ترانسفکت شده، با ماده جنتیسین (G418)(Roche, Germany) با غلظت نهایی ۴۰۰ µg/mL به مدت ۱۴ روز تیمار شدند.

اندازه‌گیری کمی فاکتور ۹ انعقادی نوترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-s پایدار:

سه روز پس از کشت سلول‌های CHO-s نوترکیب بیان‌کننده فاکتور ۹ انعقادی، سوسپانسیون سلولی جمع‌آوری شد. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه با دورrpm ۱۰۰۰ رسوب داده شدند. محیط کشت رویی جمع‌آوری شده و مقدار کمی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت با روش ساندویچ الایزا داخل میکروپلیت های پوشیده شده با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال ضد فاکتور ۹ که در کیت الایزای (DiagnosticaStago, France) AsserachromIX:Ag فراهم شده بود اندازه‌گیری شد. فاکتور ۹ متصل شده به آنتی بادی اولیه با استفاده از یک آنتی‌بادی ثانویه پلی کلونال خرگوشی ضد فاکتور ۹ که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود و به شاخص آنتی ژنی دیگری از فاکتور ۹ متصل می شد، آشکار شد. آشکارسازی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز بر روی سوبسترا (TMB) انجام شد. در نهایت واکنش‌ها با اضافه کردن اسید سولفوریک متوقف شد و رنگ به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب مشاهده شده نسبت مستقیم با غلظت فاکتور ۹ انسانی دارد. در ضمن محیط کشت جمع‌آوری

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

شده از سلول‌های ترانسفکت نشده، به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت سلولی با روش تغییر رنگ با استفاده از کیت بیوفن:

از این آزمایش به منظور بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ نوترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-s پایدار استفاده شد. در این روش از پلاسمای سیتراته افراد طبیعی به عنوان استاندارد استفاده شد. ابتدا محیط کشت حاصل از سلول‌های CHO-s نوترکیب از طریق سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰ جمع‌آوری شد. سپس محیط کشت جمع‌آوری شده به نسبت ۵۰:۱ با استفاده از بافر موجود در کیت رقیق شد و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ادامه کار طبق دستورالعمل کیت Biophen, (France) انجام شد. در این آزمایش از محیط کشت سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

خالص سازی فاکتور ۹ نوترکیب بیان شده توسط سلول‌های CHO-s نوترکیب پایدار:

برای خالص سازی فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت، سلول‌های CHO-s پایدار به مدت ۳ روز کشت داده شدند. سپس محیط کشت سلولی با سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه با دورrpm ۱۰۰۰ جمع آوری شد و با استفاده از بیدهای نیکل خالص سازی فاکتور ۹ نوترکیب که دارای برچسب هیستیدین ۶ تایی بود انجام شد. بدین منظور، حدود mg ۲۰ بید نیکل (دکتر محمدی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران)، توزن شده و در یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد شستشوی بیدها توسط ۱ میلی لیتر بافر اتصال انجام شد. پس از سانتریفیوژ در دور rpm ۱۰۰۰–۲۰۰۰ بیدها رسوب داده شده و رو شناور تخلیه شد. سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فاکتور ۹ به بیدهای نیکل اضافه شده و حدود ۱ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰–۲۰۰۰ به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به طور کامل دور ریخته شد. به رسوب بیدهای نیکل حاصل از مرحلهٔ قبل ۴ میلی لیتر بافر شستشو دهنده اضافه شد و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد.

نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰–۲۰۰۰ به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و روشناور به طور کامل تخلیه شد مرحله شستشو مجددا تکرار شد. سپس به منظور جدا کردن پروتئین‌ها از بیدهای نیکل، به رسوب حاصل از مرحلهٔ قبل با توجه به غلظت احتمالی پروتئین خالص شده حدود µl ۵۰۰ بافر خارج کننده اضافه شده و به مدت حدود ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. نمونه ها با دور rpm ۱۰۰۰–۲۰۰۰ به مدت ۱ الی ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی که حاوی پروتئین های خالص شده بود به منظور SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت.

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ:

به منظور بررسی و تائید بیان فاکتور ۹ انسانی توسط سلول‌های CHO-s نوترکیب پایدار، از روش SDS-PAGE و سپس وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ضد فاکتور ۹ انسانی استفاده شد. بدین منظور ۳ روز پس از کشت سلول‌های پایدار CHO-s، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت سلول جمع‌آوری شده و با ۲ میکرولیتر بافر نمونه ۶ برابر غلظت داخل یک ویال ۱/۵ میلی لیتری مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه داخل آب در حال جوشیدن قرار گرفت. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار گرفت. به منظور تفکیک باندهای پروتئینی از روش SDS-PAGE استفاده شد که در این روش از ژل جداکننده ۱۲٪ و ژل متراکم کننده ۵٪ استفاده شد. برای انجام وسترن بلاتینگ نیز از روش مرطوب استفاده شد. پس از انتقال پروتئین‌ها به بر روی کاغذ PVDF مراحل ایمنوبلاتینگ انجام شد. ابتدا غشاء در محلول بلوکه کننده (۵٪ شیر خشک بدون چربی حل شده در بافر TBST) روی شیکر به مدت ۱ ساعت در در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۳–۵ بار شستشو با استفاده از بافر TBST هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

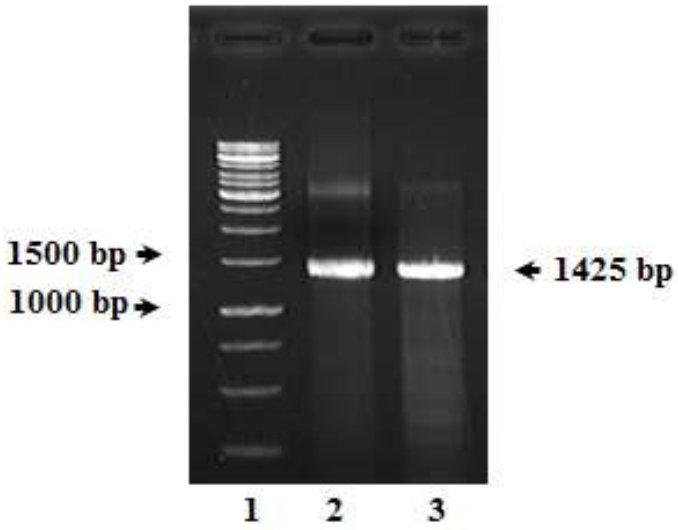
[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

مدت یک شب مواجهه با آنتی‌بادی پلی کلونال اولیه خرگوشی ضد فاکتور ۹ انسانی (Abcam, UK)با رقت ۱/۲۵۰۰ در سردخانه انجام شد. پس از شستشوی مجدد یک ساعت مواجهه با آنتی‌بادی ثانویه بزی ضد خرگوش (Millipore, USA) با رقت ۱/۲۵۰۰ در دمای آزمایشگاه انجام شد. در نهایت پس از ۳-۵ بار شستشو با بافر TBST تشخیص سیگنال با استفاده از سوبسترای ECL انجام شد.

یافته‌ها

ساخت سازه نوترکیب دو سیسترونی بیان کننده فاکتور ۹ انسانی نوترکیب:

به منظور سهولت در فرایند تخلیص فاکتور ۹ انسانی با استفاده از بیدهای نیکل، پرایمر برگشتی hFIX-*Bam*HI به گونه ای طراحی شد تا طی فرایند PCR، ۶ کدون اسیدآمینه هیستیدین به انتهای ۳' توالیرمز کننده فاکتور ۹ انسانی اضافه شود تا در نهایت پروتئین نوترکیب فاکتور ۹ با برچسب هیستیدین ساخته شود. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که قطعه ای به طول ۱۴۲۵ جفت باز ساخته شده است (شکل ۱).

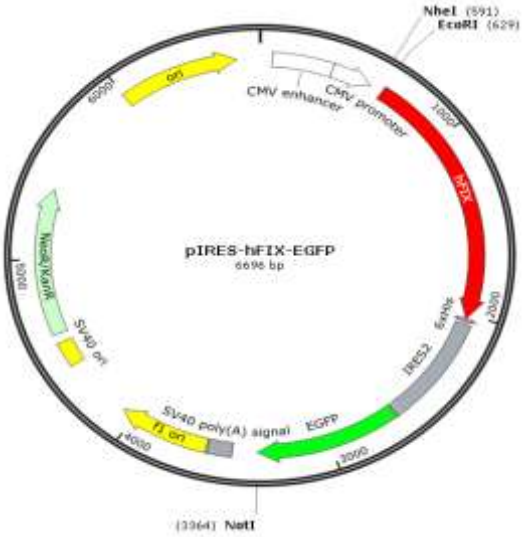


شکل ۱. محصول PCR حاصل از تکثیر توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولیDNA (1kb)، ستون۲ و ۳: محصول PCR مربوط به توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با استفاده از پرایمرهای hFIX-*Eco*RI و hFIX-*Bam*HI.

سپس محصول PCR با استفاده از آنزیم های *Eco*RI و *Bam*HI بریده شده و در جایگاه‌های مشابه در پلاسمید pIRES2-EGFP و در بالادست توالی IRES همسانه سازی گردید و در نهایت پلاسمید نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP ساخته شد (شکل ۲).

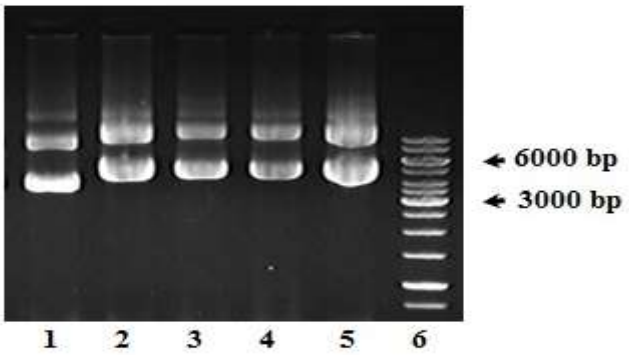
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]



شکل ۲. شکل شماتیک از پلاسمید دو سیسترونی نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP.

به منظور تائید همسانه سازی، ابتدا استخراج پلاسمید با روش miniprep انجام شد. پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪، الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب با پلاسمید IRES2-EGFP(فاقد cDNA فاکتور ۹) مقایسه شد. نتایج حاصل بیانگر سنگین‌تر بودن پلاسمیدهای نوترکیب در مقایسه با پلاسمید pIRES2-EGFP بود (شکل ۳).

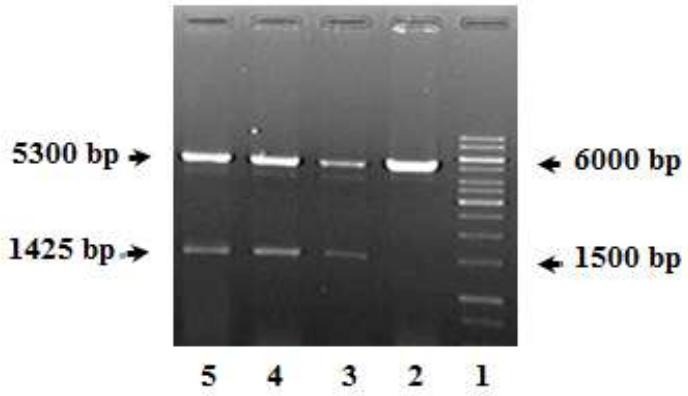


شکل ۳. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمید pIRES2-EGFP و پلاسمید نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: پلاسمید pIRES2-EGFP، ستون های ۲ الی ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP، نشانگر وزن مولکولی (1kb) DNA.

سپس پلاسمیدهای نوترکیب با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI برش داده شدند و نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که یک قطعه ۱۴۲۵ جفت بازی از پلاسمیدهای نوترکیب خارج شده است که این قطعه در پلاسمید pIRES2-EGFP بریده شده با همان آنزیم ها وجود نداشت (شکل۴).

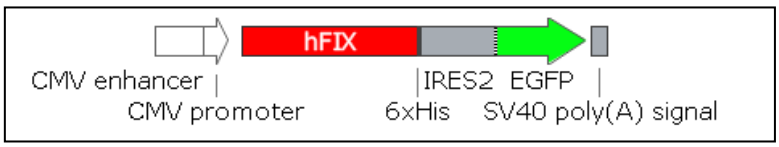
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]



شکل ۴. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمید pIRES2-EGFP و پلاسمید نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP برش خورده با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb)، ستون ۲: پلاسمید pIRES2-EGFP برش خورده با آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI، ستون‌های ۳ تا ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pIRES-hFIX-EGFP برش خورده با آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI.

این مرحله از همسانه‌سازی به منظور قرار دادن توالی رمزکننده فاکتور ۹ در بالا دست توالی نوکلئوتیدی IRES-EGFP انجام شد تا در مرحله بعد کل توالی نوکلئوتیدی متشکل از hFIX-IRES-EGFP به پلاسمید بیانی pcDNA3.1 وارد شود (شکل ۵).

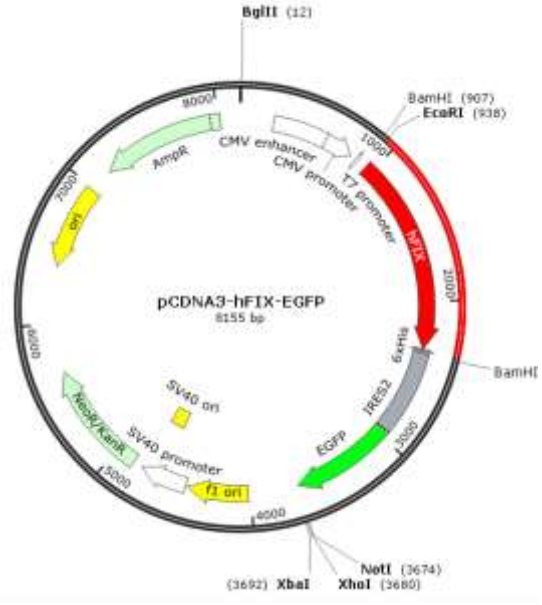


شکل ۵. نحوه اتصال توالی کد کننده hFIX به توالی نوکلئوتیدی IRES-EGFP در پایین دست پروموتر CMV در وکتور بیانی pCDNA3.1.

بدین منظور کل قطعه مورد نظر توسط آنزیم های *Eco*RI و *Not*I از پلاسمید نوترکیب pIRES2-hFIX-EGFP بریده شده و در جایگاه‌های مشابه در پلاسمید بیانی pcDNA3.1 در پایین دست پروموتر CMV وارد شدند. در نهایت پلاسمید بیانی نوترکیب pcDNA-hFIX-EGFP ساخته شد. (شکل ۶).

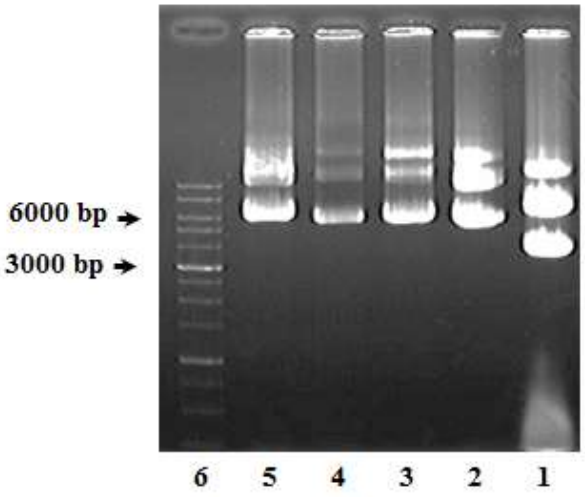
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]



شکل ۶. شکل شماتیک از پلاسمید دو سیسترونی نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP

به منظور تائید همسانه سازی، الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب با پلاسمیدهای غیرنوترکیب pcDNA3.1 بر روی آگارز ۱٪ مقایسه شد. نتایج بیانگر سنگین بودن پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA-hFIX-EGFP در مقایسه با پلاسمید pcDNA3.1 بود (شکل ۷).

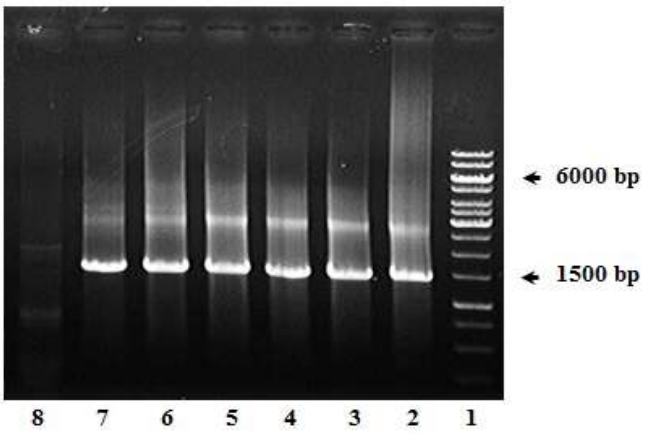


شکل ۷. مقایسه الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP با پلاسمید pcDNA3.1 بر روی ژل آگارز ۱٪ .
ستون ۱: پلاسمید pcDNA3.1، ستون ۲ تا ۵: پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP، ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

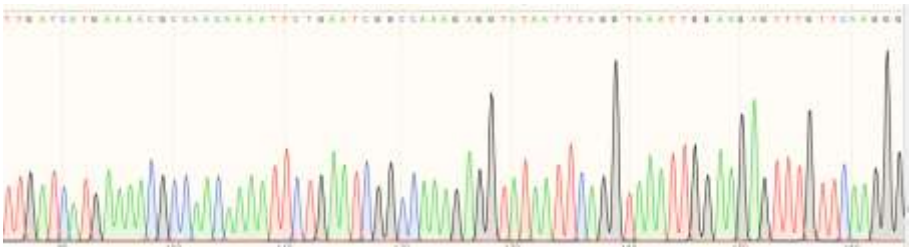
[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

به منظور تائید بیشتر صحت همسانه سازی، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی فاکتور ۹ بر روی کلون‌های نوترکیب به دست آمده انجام شد و نتایج آن با کلنی PCR کلون‌های غیر نوترکیب بر روی ژل آگارز ۱٪ مقایسه شد (شکل ۸). همان‌طور که در شکل ۸ مشخص است فقط محصول PCR حاصل از کلون‌های نوترکیب در ناحیه حدود ۱۴۲۵ جفت بازی باند مشخص و متمایزی ایجاد کرده است.



شکل ۸. کلنی PCR کلون‌های نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGFP در مقایسه با کلنی PCR کلون‌های غیر نوترکیب. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb)، ستون ۲ تا ۷: کلونی PCR کلون‌های نوترکیب، ستون ۸: کلونی PCR کلون‌های غیر نوترکیب.

در نهایت به منظور تائید نهایی صحت توالی hFIX همسانه سازی شده، توالی یابی ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی (hFIX-*Eco*RI و hFIX-*Bam*HI) به عنوان آغازگرهای رفتی و برگشتی انجام شد (شکل ۹).



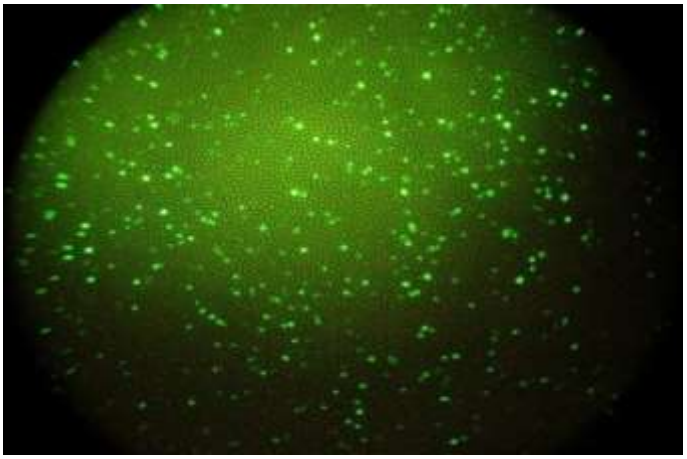
شکل ۹. بخشی از نتیجه توالی یابی cDNA فاکتور ۹ انسانی کلون شده در پلاسمید نوترکیب pcDNA3-hFIX-EGF با استفاده از پرایمر رفتی hFIX-*Eco*RI.

ساخت سلول‌های نوترکیب CHO-s پایدار:

سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب خطی شده پس از ۱۴ روز تیمار با ماده جنتیسین (G418) با غلظت نهایی ۴۰۰µg/mL زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز درخشان مشاهده شدند (شکل ۱۰).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

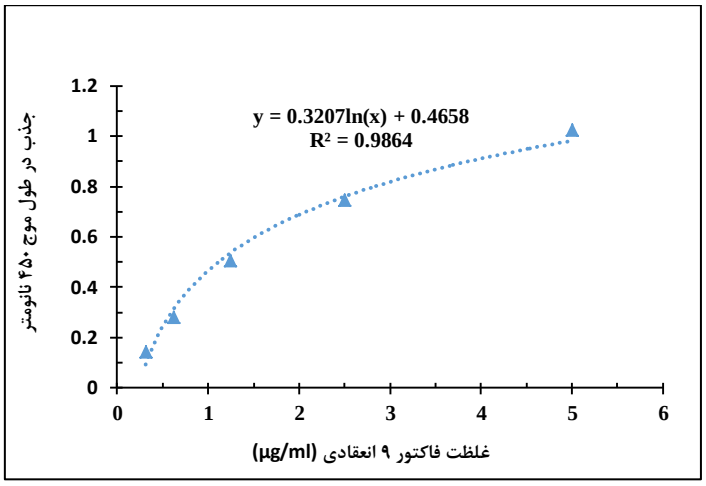
[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]



شکل ۱۰. تصویر سلول‌های ترانسفکت شده CHO-s پس از ۱۴ روز تیمار با جنتیسین (G418) زیر میکروسکوپ فلورسنت.

بررسی کمی بیان فاکتور ۹ انعقادی انسانی نوترکیب با استفاده از روش الایزا:

سه روز پس از کشت سلول‌های نوترکیب و غیر نوترکیب (به عنوان کنترل منفی) آزمون الایزا بر روی محیط کشت سلول‌ها انجام شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد (شکل ۱۱) میزان فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت، ۱۵۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت به ازای 10^6 سلول به دست آمد.



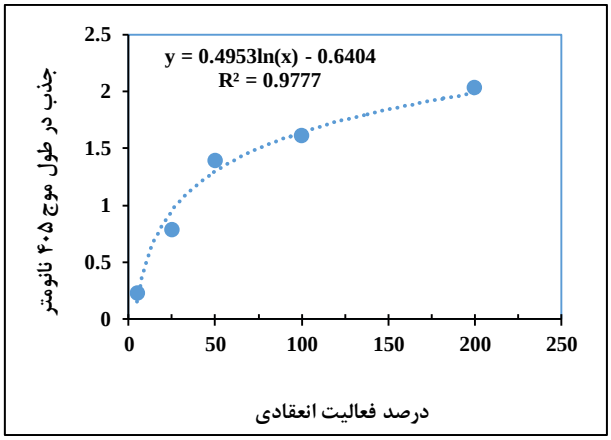
شکل ۱۱. منحنی استاندارد الایزا. محور عمودی نشان دهنده جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور افقی غلظت‌های مختلف فاکتور ۹ پلاسمایی را بر حسب µg/mL نشان می‌دهد.

بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ انسانی نوترکیب:

در این روش محیط کشت سلول‌های نوترکیب ۳ روز پس از کشت جمع‌آوری و آزمایش فعالیت انعقادی بر پایه کروموژنیک انجام شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد (شکل ۱۲)، میزان فعالیت انعقادی فاکتور ۹ نوترکیب، ۰/۲ mU/mL ± ۵/۶ محاسبه شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

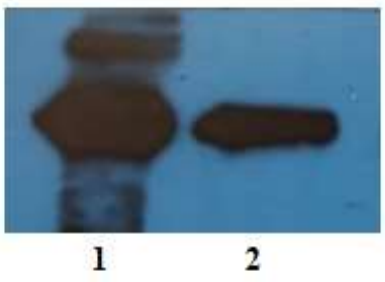
[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]



شکل ۱۲. منحنی استاندارد تست انعقاد. محور عمودی نشان دهنده جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر و محور افقی درصد فعالیت انعقادی را نشان می‌دهد.

SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ:

پس از انجام SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اختصاصی فاکتور ۹ بر روی نمونه های خالص شده بیان فاکتور ۹ نوترکیب مورد تائید قرار گرفت (شکل ۱۳).



شکل ۱۳. وسترن بلاتینگ فاکتور ۹ نوترکیب تولید شده توسط سلول‌های CHO-s پایدار پس از خالص‌سازی. ستون ۱: فاکتور ۹ مشتق شده از پلاسما به عنوان کنترل، ستون ۲: فاکتور ۹ خالص شده در این مطالعه.

بحث

رده‌های سلولی پستانداران به طور وسیع برای تولید بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب دارویی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که شامل رده سلولی میلومای موشی NS0 و SP2/0، سلول‌های CHO، سلول‌های PerC6، سلول‌های کلیه جنین انسان (Human Embryonic Kidney 293, HEK 293) و سلول‌های کلیه نوزاد همستر (Baby Hamster Kidney, BHK) هستند. سلول‌های CHO به دلیل دارا بودن ظرفیت بالای تولید پروتئین دگرساخت (Heterologous) و قابلیت کشت با دانسیته بالای سلولی به صورت معلق در محیط تعریف شده شیمیایی و عاری از پروتئین، مزایای فراوانی برای تولید پروتئین‌های دارویی دارند. این سلول‌ها به عنوان سیستم های انتخابی برای تولید داروهای زیستی تبدیل شده‌اند. به عنوان مثال تا سال ۲۰۱۲ تقریباً ۷۰٪ از داروهای زیستی در رده سلول‌های CHO تولید شده است (۲۱ و ۲۰)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

ترانسفکشن پایدار سلول‌های پستانداران به منظور تولید انبوه بسیاری از پروتئین های نوترکیب دارویی و خالص سازی آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ ولی انتخاب یک کلون پایدار بیان کننده پروتئین از بین تعداد زیادی از کلون‌های نوترکیب، اغلب بسیار زمان‌بر و پر زحمت است. به منظور افزایش کارایی انتخاب کلون‌های پایدار، استفاده از یک ژن گزارشگر ازجمله EGFP می‌تواند بسیار سودمند باشد (۲۲). در این مطالعه به منظور تولید سلول‌های CHO-s پایدار بیان کننده فاکتور ۹ انسانی، از یک سیستم بیانی دو سیسترونی استفاده شده است. این سیستم بیانی امکان بیان همزمان فاکتور ۹ انسانی به همراه پروتئین فلورسنت سبز به عنوان پروتئین گزارشگر را فراهم می‌کند. به منظور ایجاد سیستم بیانی دو سیسترونی که قابلیت بیان هم‌زمان پروتئین فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز را داشته باشد، از وکتور pIRES2-EGFP استفاده شد. این پلاسمید مجهز به جایگاه داخلی ورود ریبوزوم (Internal Ribosome Entry Site, IRES)، با منشأ ویروس انسفالومیوکاردیتیس، است که بین Multiple cloning Site (MCS) و توالی رمز کننده پروتئین فلورسانت سبز قرار گرفته است و امکان بیان هم‌زمان دو پروتئین از یک mRNA دو سیسترونی را فراهم می‌کند. ترجمه پروتئین اول از ناحیه کلاهک واقع در انتهای ’۵ mRNA و ترجمه پروتئین دوم از ناحیه IRES آغاز می‌گردد (۲۳ و۲۲)؛ بنابراین یک mRNA امکان بیان دو پروتئین متفاوت را در سلول‌های پستانداران فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر پروتئین اول فاکتور ۹ انسانی است که به دلیل دارا بودن پپتید نشانه به درون محیط کشت ترشح می‌شود و پروتئین دوم، پروتئین گزارشگر EGFP، به صورت سیتوپلاسمی باقی می‌ماند.

برای ساخت وکتور بیان کننده دو سیسترونی ابتدا توالی رمز کننده فاکتور ۹ انسانی با روش PCR تکثیر شده و در وکتور pIRES2-EGFP در بالادست توالی IRES وارد گردید. سپس مجموعه توالی نوکلئوتیدی فاکتور ۹ انسانی، IRES و EGFP با استفاده از آنزیم های *Eco*RI و *Not*I بریده شده و در وکتور بیانی pcDNA3.1 و در پایین دست پروموتر CMV وارد شد. سلول پایدار بیان کننده فاکتور ۹ انسانی از طریق خطی کردن پلاسمید دو سیسترونی نوترکیب و ترانسفکشن آن به داخل سلول‌های CHO-s و تیمار با ماده جنتیسین ایجاد شدند. سلول‌های بیان کننده پایدار زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز درخشان رؤیت شدند. سلول‌های بیان کننده EGFP را می‌توان با استفاده از روش سل سورتینگ به صورت جمعیت‌های مختلف سلولی بر حسب میزان شدت سیگنال فلورسنت آن‌ها جدا سازی کرد؛ بنابراین استفاده از سیستم‌های دو سیسترونی فرایند جداسازی کلون‌های نوترکیب و آنالیزهای بعدی آن‌ها را تسهیل می‌کند. سلول‌های پایدار بیان کننده EGFP از نظر بیان پروتئین فاکتور ۹ انسانی با استفاده از تست های الایزا و وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاکی از بیان فاکتور ۹ در سلول‌های CHO-s بیان کننده EGFP بود. مراحل بعدی این تحقیق می‌تواند شامل جدا سازی سلول‌های بیان کننده و انتخاب کلون‌های نوترکیب دارای بیان بالای فاکتور ۹ و بررسی میزان بیان در طی نسل‌های بعدی توسط هر یک از کلون‌ها باشد. این روش اگرچه جداسازی کلون‌های نوترکیب را تسهیل می‌کند؛ ولی به دلیل آنکه در این سیستم بیانی فقط یک کپی از ژن وارد ژنوم می‌شود و تکثیر ژنی رخ نمی‌دهد، برای تولید انبوه در مقیاس صنعتی مناسب نیست. برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب می‌توان از طریق ترانسفکشن های متعدد تعداد کپی ژن فاکتور ۹ و در نتیجه راندمان تولید را افزایش داد. بعلاوه بعد از جداسازی و شناسایی کلون نوترکیب بیان کننده با راندمان بالا، لازم است که ژن EGFP با استفاده از روش‌هایی مجدداً خاموش شود که این امر نیز یکی دیگر از معایب و محدودیت‌های این سیستم است (۲۱). یکی از راهکارهای افزایش بیان پروتئین نوترکیب در یک سیستم بیانی دگرساخت (هترولوگ)، بهینه سازی کدون ها (codon optimization) بر اساس

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

codon usage میزبان است. توالی کد کننده فاکتور ۹ انسانی با توالی نوکلئوتیدی طبیعی در که پژوهش‌های قبلی این گروه همسانه سازی و بیان آن در سلول‌های HEK293، با منشأ انسانی، مورد بررسی قرار گرفته بود در این مطالعه نیز در نظر گرفته شد (۲۲). از آنجا که ژن فاکتور ۹ انسانی و همچنین میزبان CHO هر دو یوکاریوتی می‌باشند؛ لذا برای مطالعه اولیه بیان فاکتور ۹ انعقادی در سلول‌های CHO-s بهینه سازی کدون‌ها انجام نشد؛ البته خود می‌تواند به عنوان یک مطالعه مستقل، با عنوان تأثیر بهینه‌سازی کدون ها بر اساس codon usage سلول‌های CHO بر میزان بیان فاکتور ۹ انسانی در این سلول‌ها مد نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

مطالعات ما حاکی از بیان هم‌زمان فاکتور ۹ و پروتئین فلورسنت سبز به صورت دو سیسترونی بود. فاکتور ۹ به دلیل دارا بودن پپتید نشانه به محیط کشت ترشح شد درحالی‌که پروتئین فلورسنت سبز به صورت داخل سیتوپلاسمی باقی ماند. فاکتور ۹ ترشح شده به محیط کشت با استفاده از روش SDS-PAGE تائید شد و مقدار بیان فاکتور ۹ با استفاده از تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. این سیستم فرایند جداسازی کلون‌های نوترکیب با استفاده از سل سورتینگ، در فاز بعدی مطالعات را تسهیل می‌کند و امکان بررسی بیان پایدار فاکتور ۹ در هر یک از کلون‌های جداسازی شده را فراهم می‌کند. با این سیستم بیانی همچنین می‌توان تعداد نسل هایی که بیان فاکتور ۹ انعقادی نوترکیب را فراهم می‌کنند، مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که امکانات انجام پروژه را فراهم کردند سپاسگزاری می‌گردد. هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند. کد اخلاق مطالعه IR.BUMS.REC.1399.260 است.

منابع

1.Giangrande P. Haemophilia B: christmas disease.Expert Opin Pharmacother. 2005;6(9):1517-24.
2.Camerino G, Grzeschik KH, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP,et al. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (Hemophilia B locus). Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81(2):498-502.
3.Ghasemi F, Zomorodipour A, Karkhane AA, Khorramizadeh MR. *In silico* designing of hyper-glycosylated analogs for the human coagulation factor IX. J Mol Graph Model.2016;68:39-47.
4.Chia J, Louber J, Glauser I, Taylor S, Bass GT, Dower SK, et al.Half-life–extended recombinant coagulation factor IX–albumin fusion protein is recycled via the FcRn-mediated pathway. J Biol Chem. 2018;293(17):6363-73.
5.Franchini M, Frattini F, Crestani S, Sissa C, Bonfanti C.. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. Biologics. 2013;7:33-38.
6.Kundu RK, Sangiorgi F, Wu LY, Kurachi K, Anderson WF, Maxson R, et al. Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia B in mice. Blood. 1998;92(1):168-74.
7.Franchini Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. Orphanet J Rare Dis. 2012;7(1):1-8.
8.Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C,et al.Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. Blood. 2012;120(12):2405-11.
9.Sankar AD, Weyand AC, Pipe SW. The evolution of recombinant factor replacement for hemophilia. Transfusion and Apheresis Science. Transfus Apher Sci. 2019;58(5):596-600.
10.Jayandharan GR, Srivastava A. Hemophilia: genetics, diagnosis and treatment.J Genet Syndr Gene Ther. 2011;1:1-12.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]

11.White II GC, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. Thromb Haemost. 1997;78(1):261-5.
12.Zacchi LF, Roche-Recinos D, Pegg CL, Phung TK, Napoli M, Aitken C,et al.Coagulation factor IX analysis in bioreactor cell culture supernatant predicts quality of the purified product. Communications Biology. 2021;4(1):1-19.
13.Windyga J, Solano Trujillo MH ,Hafeman AE. BAX326 (RIXUBIS): a novel recombinant factor IX for the control and prevention of bleeding episodes in adults and children with hemophilia B.Ther Adv Hematol. 2014;5(5):168-80.
14.Pegg CL, Zacchi LF, Recinos DR, Howard CB, Schulz BL. Identification of novel glycosylation events on human serum-derived Factor IX. Glycoconjugate Journal. 2020;37(4):471-83.
15.Zhong D, Smith KJ, Birktoft JJ, Bajaj SP. First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa/tissue factor but not by factor XIa. Proc Natil Acad Sci. 1994;91(9):3574-8.
16.Ghasemi F, Khorramizadeh MR, Karkhane AA, Zomorodipour A. Studying the Expression Efficiencies of Human Clotting Factor IX Analogs, Rationally Designed for Hyper-glycosylation. Iran J Pharm Res. 2021;20(2):523-535.
17.Nielsen FS, Schmidt AS, Kristensen AK, Nielsen AD, Kristensen BK, Palm L. Characterisation of recombinant factor IX before and after GlycoPEGylation. Int J Pharm. 2020;588:119654.
18.Samis JA, Ramsey GD, Walker JB, Nesheim ME, Giles AR. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. Blood. 2000;95(3):943-51.
19.Tuddenham EG, Cooper DN. The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders Oxford University Press, USA; 1994.
20.Kim JY, Kim YG, Lee GM, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 93(3):917-30.
21.Croset A, Delafosse L, Gaudry J-P, Arod C, Glez L, Losberger C,et al.Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. J Biotechnol. 2012;161(3):336-48.
22.Gurtu V, Yan G, ZhangG. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 1996;229(1):295-8.
23.Khorshidi S, Zomorodipour A, Behmanesh M, Vatandoost J, Bos MH. Functional expression of the human coagulation factor IX using heterologous signal peptide and propeptide sequences inmammalian cell line. Biotechnol lett. 2012;37(10):1773-1781.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-16]

[DOI: 10.61186/sjku.28.2.12]