ORIGINAL ARTICLE

Design and Construction of an Expression Vector for the Expression of a Human VEGF-COP-GFP Fusion Protein in Escherichia coli

Sam Torabi Goodarzi[1]
Issa Layali[2]
Shakila Ghanbari3
Hadis RanjbarQorveh4
Amir Hossien Torabi Goodarzi5

1 Department of Biochemistry and Biophysics, TeMS.C, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 Associate Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
3 MSc Student in Biochemistry, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran, Iran
4 BSc Student in Cellular and Molecular Biology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran, Iran
5 Medical Student, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received April 27, 2026; Accepted October 13, 2026)

Abstract

Background and purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a vital role in physiological processes such as angiogenesis and tissue repair. Given its involvement in the pathophysiology of various diseases, including cardiovascular disease, ocular disorders, and cancer, the production of adequate quantities of recombinant VEGF is of great importance. In this study, the COP-GFP fluorescent reporter gene was used to facilitate the monitoring of cloning success and recombinant protein expression through fluorescence.

Materials and methods: The gene construct was designed by fusing the human VEGF gene with the COP-GFP gene. This construct was cloned into the pET22b expression vector and subsequently introduced into E. coli strains for cloning and into BL21 cells for protein expression. Expression of the VEGF-COP-GFP fusion protein was induced by adding IPTG to the culture medium. Successful protein expression and the expected molecular weight were assessed by SDS-PAGE and Western blotting. The recombinant VEGF-COP-GFP protein was then purified from the cell lysate using Ni-NTA chromatography.

Results: The VEGF-COP-GFP fusion construct was successfully expressed in the E. coli prokaryotic expression system. SDS-PAGE and Western blotting confirmed protein expression and a molecular weight consistent with the expected size. Purification by Ni-NTA chromatography provided a straightforward and cost-effective approach to obtaining the recombinant protein. The COP-GFP reporter enabled direct monitoring of the fusion protein through fluorescence.

Conclusion: The results demonstrate the successful expression of the VEGF-COP-GFP fusion protein in the E. coli prokaryotic expression system. The incorporation of COP-GFP enables fluorescence-based tracking of the fusion protein, providing a useful tool for future functional studies. This approach may also support the development of production methods for VEGF and other recombinant proteins for research and potential therapeutic applications.

Keywords: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF),COP- GFP: COP- GFP,Recombinant Protein,Prokaryotic Expression System,Cloning

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (Supple 1): 39-51 (Persian).

Corresponding Author: Issa Layali - TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran, Iran (E-mail: Issa.layali@iau.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ویژه نامه آبان سال ۱۴۰۵ (۵۱-۳۹)

طراحی و ساخت وکتور بیانی برای بیان هم زمان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی (VEGF) و پروتئین فلورسنت (COP-GFP) در باکتری(Escherichia coli)

سام ترابی گودرزی[۱]
عیسی لیالی[۲]
شکیلا قنبری[۳]
حدیث رنجبر قروه[۴]
امیر حسین ترابی گودرزی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) نقشی حیاتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانندآنژیوژنز و ترمیم بافتی ایفا می‌کند. با توجه به دخالت VEGF در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات چشمی و رشد تومورهای سرطانی، تولید مقادیر کافی از این پروتئین نوترکیب از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش، برای تسهیل پایش و ارزیابی بیان پروتئین، از ژن گزارشگر فلورسنت COP-GFP استفاده شده است که امکان ردیابی بصری موفقیت کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب را فراهم می‌آورد.

مواد و روش ها: فرآیند پژوهش با طراحی سازه ژنی شامل ادغام ژن VEGF انسانی با ژن COP-GFP آغاز شد. این سازه در وکتور بیانی pET22b کلون گردید و سپس به سویه‌های باکتریایی E. coli برای کلونینگ و سویه BL21 برای بیان منتقل شد. بیان فیوژن پروتئین VEGF-COP-GFP با افزودن IPTG به محیط کشت القا شد. صحت بیان پروتئین و وزن مولکولی آن با SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید گردید. پروتئین نوترکیب VEGF-COP-GFP نهایتاً از لیزات سلولی با استفاده از کروماتوگرافی Ni-NTA خالص‌سازی شد.

یافته‌ها: سازه ژنی فیوژن VEGF-COP-GFP با موفقیت در سیستم پروکاریوتی E. coli بیان شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و وسترن بلات، صحت بیان پروتئین نوترکیب و وزن مولکولی مورد انتظار را تأیید کرد. خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی Ni-NTA، امکان تولید سریع و اقتصادی VEGF را فراهم نمود و حضور ژن گزارشگر COP-GFP، ردیابی مستقیم پروتئین از طریق فلورسانس را میسر ساخت.

استنتاج: نتایج نشان‌دهنده موفقیت در بیان فیوژن پروتئین VEGF-COP-GFP در سیستم پروکاریوتی E. coli است. حضور COP-GFP امکان ردیابی مستقیم پروتئین را از طریق فلورسانس فراهم کرده و در مطالعات عملکردی آینده ارزشمند خواهد بود. این دستاورد، پتانسیل بالایی برای توسعه فرآیندهای تولید صنعتی و تحقیقاتی VEGF و سایر پروتئین‌های درمانی نوترکیب دارد.

واژه های کلیدی: فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، COP-GFP، پروتئین نوترکیب، سیستم بیان پروکاریوتی، کلونینگ

مولف مسئول: عیسی لیالی- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. E-mail: Issa.layali@iau.ac.ir .
۱. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار،گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴. دانشجوی کارشناسی سلولی و مولکولی،واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۵. دانشجوی دکترای عمومی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان،خرم آباد ، ایران.
تاریخ دریافت : ۱۴۰۵/۲/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۴/۲/۱۳ تاریخ تصویب : ۱۴۰۵/۷/۲۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

مقدمه

پروتئین‌های نوترکیب به‌عنوان یکی از دستاوردهای مهم زیست‌فناوری مدرن، نقش کلیدی در توسعه داروهای زیستی، درمان بیماری‌ها، و مطالعات پایه‌ای زیست‌شناسی سلولی ایفا می‌کنند. فرایند تولید این پروتئین‌ها مستلزم کلون کردن ژن هدف در وکتورهای بیانی مناسب و بیان آن‌ها در میزبان‌های منتخب است. در میان سیستم‌های مختلف بیان، سیستم‌های پروکاریوتی به‌ویژه باکتری Escherichia coli به دلیل رشد سریع، هزینه پایین، سهولت کار و امکانات فراوان مهندسی ژنتیک، همچنان به‌عنوان یکی از پرکاربردترین میزبان‌ها شناخته می‌شوند(۳-۱).

یکی از پروتئین‌هایی که توجه زیادی را به خود جلب کرده، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)است. این پروتئین نقش بسیار مهمی در تشکیل رگ‌های خونی (آنژیوژنز)، ترمیم بافتی، و همچنین در پاتوفیزیولوژی بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی‌عروقی و دژنراسیون شبکیه دارد. به همین دلیل، تولید و بررسی عملکرد این فاکتور در مدل‌های مختلف، یکی از اولویت‌های پژوهشی در حوزه پزشکی مولکولی محسوب می‌شود(۵-۴).

از سوی دیگر، برای پایش فرایندهای بیان ژن، استفاده از ژن‌های گزارشگر بسیار رایج است. ژن GFP و به‌طور ویژه نسخه اصلاح‌شده آن یعنی COP-GFP، به دلیل تولید فلورسانس سبز در سلول‌های بیان‌کننده، ابزاری قدرتمند برای بررسی موفقیت کلونینگ، میزان بیان، محل تجمع پروتئین و رفتار آن در سلول‌ها به‌شمار می‌رود(۸-۶). با توجه به اهمیت VEGF و نقش آن در تنظیم رگ‌زایی، اتصال این پروتئین به ژن گزارشگر فلورسنت می‌تواند ابزاری کارآمد جهت ردیابی، تعیین جایگاه و بررسی‌های عملکردی فراهم سازد. بر همین اساس، این مطالعه با هدف طراحی، ساخت و بیان پروتئین فیوژن نوترکیب شامل پروتئین گزارشگر فلورسنت Cop-GFP و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی (hVEGF) در سیستم پروکاریوتی *Escherichia coli*انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1404.125 انجام شد.

طراحی و ساخت سازه ژنی فیوژن

سازه ژنی حاوی توالی کدکننده (*coding sequence*) پروتئین فیوژن COP-GFP-hVEGF طراحی شد. در این سازه، توالی COP-GFP در موقعیت N-terminal و توالی hVEGF در موقعیت C-terminal قرار گرفت. طراحی توالی ژنی، بررسی فریم خوانش، تعیین جایگاه اتصال قطعات ژنی و انتخاب جایگاه‌های مناسب آنزیم‌های محدودکننده با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench انجام شد.

ابتدا سازه ژنی فیوژن در وکتور واسط pGH کلون شد. پلاسمید نوترکیب pGH-COP-GFP-hVEGF پس از استخراج از سلول‌های باکتریایی و تکثیر، با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. صحت حضور قطعه ژنی مورد نظر پس از جداسازی و تأیید اندازه قطعه بررسی شد.

کلونینگ اولیه در E. coli Top10F′ و ساب‌کلونینگ در وکتور بیانی pET22bپلاسمید نوترکیب pGH-COP-GFP-hVEGF به سلول‌های مستعد E. coli Top10F′ با روش شوک حرارتی و تیمار کلرید کلسیم منتقل شد. سلول‌های ترانسفورم‌شده در محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب کشت داده شدند. پس از رشد کلنی‌ها، پلاسمید استخراج و حضور سازه ژنی با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و الکتروفورز تأیید شد.

پس از تأیید سازه اولیه، قطعه ژنی COP-GFP-hVEGF با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI از وکتور واسط pGH جدا شد. قطعه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

استخراج‌شده پس از خالص‌سازی از ژل، در وکتور بیانی pET22b که با همان آنزیم‌ها هضم شده بود، وارد گردید. اتصال قطعه ژنی به وکتور بیانی با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد.

محصول لیگیشن به سلول‌های مستعد E. coli Top10F' منتقل شد و پس از کشت در محیط انتخابی، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج و تأیید نهایی شدند. پلاسمید بیانی تأییدشده pET22b-COP-GFP-hVEGF برای مرحله بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال پلاسمید نوترکیب به E. coli BL21 (DE3) و القای بیان پروتئین

پلاسمید نوترکیب pET22b-COP-GFP-hVEGF به سویه بیانی E. coli BL21 (DE3) با روش شوک حرارتی منتقل شد. این سویه به دلیل دارا بودن سیستم بیان T7 RNA polymerase، برای تولید پروتئین نوترکیب تحت کنترل پروموتر T7 انتخاب گردید.

یک کلون تأییدشده از E. coli BL21 (DE3) حامل پلاسمید نوترکیب در محیط TB Broth کشت داده شد. پس از رسیدن تراکم سلولی به OD600 برابر ۰٫۶–۰٫۸، بیان پروتئین فیوژن با افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار القا گردید. نمونه‌برداری در سه زمان شامل قبل از القا، ۳ ساعت پس از القا و پس از انکوباسیون شبانه انجام شد تا روند تولید پروتئین نوترکیب بررسی شود.

استخراج و تخلیص پروتئین فیوژن با کروماتوگرافی Ni-NTA

پس از القای بیان، سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری و با استفاده از روش سونیکیشن لیز شدند. لیزات سلولی حاصل پس از جداسازی بخش‌های نامحلول، برای تخلیص پروتئین فیوژن مورد استفاده قرار گرفت.

پروتئین COP-GFP-hVEGF به‌صورت دارای برچسب هیستیدین(His-tag) دار طراحی شده بود؛ بنابراین تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA انجام شد. لیزات سلولی بر روی ستون حاوی رزین Ni-NTA بارگذاری گردید و پروتئین دارای His-tag به رزین متصل شد. سپس شست‌وشو با بافر حاوی غلظت پایین ایمیدازول (۱۰–۳۰ میلی‌مولار) انجام شد تا پروتئین‌های غیر اختصاصی حذف شوند. در مرحله نهایی، با افزایش غلظت ایمیدازول (۱۰۰–۲۵۰ میلی‌مولار)، پروتئین فیوژن هدف از ستون جدا و جمع‌آوری شد.

بررسی بیان پروتئین با SDS-PAGE

برای بررسی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب، نمونه‌های پروتئینی پس از افزودن بافرلودینگ حاوی ۲-مرکاپتواتانول، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. سپس، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری و الکتروفورز انجام شد.

پس از پایان الکتروفورز، ژل از بین صفحات شیشه‌ای خارج شده و در محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو G250 قرار گرفت. پس از مشاهده باندهای پروتئینی، ژل در محلول رنگ‌زدا قرار داده شد تا زمینه رنگی حذف و باندهای اختصاصی آشکار شوند.

تأیید اختصاصی بیان پروتئین با وسترن بلات

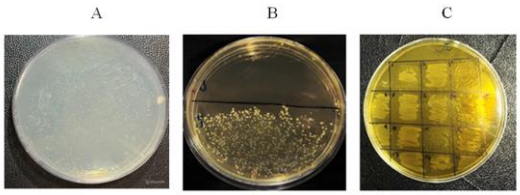
به منظور تأیید اختصاصی بیان پروتئین فیوژن COP-GFP-hVEGF، نمونه‌های پروتئینی پس از SDS-PAGE به غشای PVDF منتقل شدند. غشا پس از مسدودسازی(Blocking) با آنتی‌بادی اولیه ضد His-tag انکوبه گردید. سپس آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه‌شده با آنزیم HRP اضافه شد و آشکارسازی سیگنال با استفاده از سوبسترای مناسب انجام گرفت.

شدت باندهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزارهای تحلیل تصویر بررسی شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و وسترن بلات برای تأیید بیان و تخلیص موفق پروتئین فیوژن COP-GFP-hVEGF در سویه E. coli BL21 (DE3) مورد استفاده قرار گرفت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

یافته ها

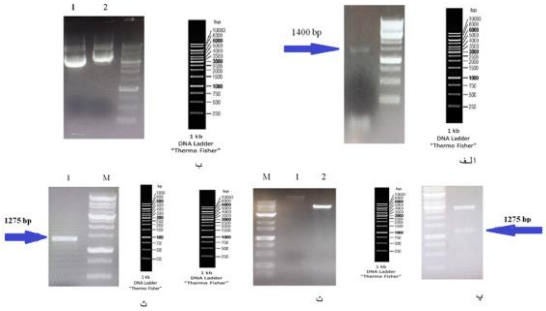
انتقال (ترانسفورم) پلاسمید نوترکیب pGH-CopGFP-hVEGF در باکتری Top10F' بعد از طراحی و سفارش سازه ژنی ، پلاسمید pGH-CopGFP-hVEGF به سلول‌های مستعد Top10F' تحت شوک حرارتی ترانسفرم شدند. کلنی‌های رشد یافته، نمایانگر باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب بودند(تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: پلاسمید نوترکیب pGH-CopGFP-hVEGF به باکتری Top10 F ترانسفرم شد.A: پلیت نمونه pGH-CopGFP-hVEGF .B :پلیت کنترل مثبت و منفی. C: کشت ماتریکس از تک کلونی.

کلونی PCR

برای انجام PCR از کلون های بدست آمده بعنوان نمونه استفاده شد و با پرایمر های M13 فوروارد و M13 ریورس تست انجام گردید. مشاهده باند ~۱۴۰۰ جفت‌بازی در کلون‌های منتخب، صحت درج قطعه ژن را تأیید کرد(تصویر شماره ۲- الف).تخلیص پلاسمید از باکتری های Top10F' حاوی پلاسمید نوترکیب pGH-CopGFP-hVEGF پس از کشت و تکثیر باکتری‌های ترانسفورم‌شده با پلاسمید حاوی ژن CopGFP-hVEGF در محیط LB ، تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت FAVORGEN انجام شد. نمونه‌های تخلیص‌شده در دو الوشن جداگانه تهیه گردیدند. بررسی کمی و کیفی DNA با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد نشان‌دهنده‌ی حضور باند واضح در موقعیت مورد انتظار بود که بیانگر کیفیت مناسب پلاسمید استخراجی جهت هضم آنزیمی و ادامه فرآیند کلونینگ می‌باشد(تصویر شماره ۲- ب).



تصویر شماره ۲: الف) باند ~۱۴۰۰ جفت‌بازی در کلون‌های منتخب .

ب) الکتروفورز پلاسمید نوترکیب pGH-CopGFP-hVEGF بر روی ژل آگارز ۱**درصد** پس از استخراج به روش کیت. (۱) الوشن شماره ۱؛ (۲) الوشن شماره ۲؛ (۳) مارکر وزن مولکولی DNA (1Kb DNA Ladder).

پ) الکتروفورز وکتور pGH-CopGFP-hVEGF برش داده شده توسط آنزیم های Nde1 و Xho1

جدول شماره ۱ .وکتور pGH-CopGFP-hVEGF دایجست شده M مارکر.

ت) الکتروفورز وکتور pET 22b برش داده شده توسط آنزیم های Nde1 و Xho1. جدول شماره ۱ .وکتور pET 22b دایجست نشده. جدول شماره ۲ وکتور pET 22b دایجست شده M مارکر.

ث) استخراج ژن CopGFP-hVEGF .

هضم آنزیمی پلاسمید pGH-CopGFP-hVEGF با آنزیم های Nde1 و Xho1

برای جداسازی قطعه ژنی VEGF-CopGFP از پلاسمید pGH ، از آنزیم‌های محدودکننده XhoI و NdeI استفاده شد. محصول هضم روی ژل آگارز ۱ ران شده و مشاهده باند ~۱۲۷۵ جفت‌بازی تأیید کرد که قطعه مورد نظر به درستی جدا شده است. این قطعه جهت اتصال به وکتور بیانی مورد استفاده قرار گرفت(تصویر شماره ۲- پ).

هضم آنزیمی پلاسمید pET 22b با آنزیم های Nde1 و Xho1

وکتور بیانی pET22b با همان دو آنزیم(Nde1 و Xho1)هضم شد تا آماده دریافت قطعه ژن هدف شود. بررسی ژل آگارز از محصول هضم نشان داد که وکتور

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

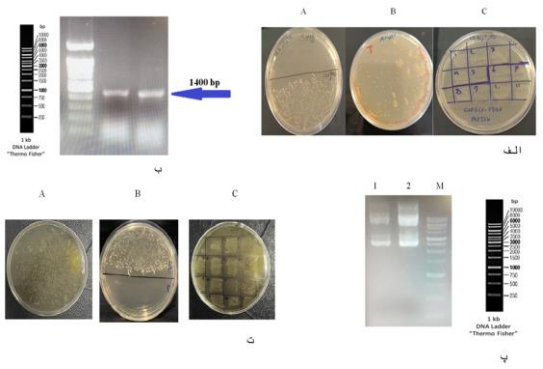
به طور کامل برش خورده و باند متناظر آن به درستی در ژل ظاهر شده است(تصویر شماره ۲- ت).

استخراج ژل CopGFP-hVEGF

برای انجام استخراج ژن CopGFP-hVEGF از ژل از کیت FAVORGEN استفاده شد. در ابتدا نمونه در ژل الکتروفورز ۱ درصد ران شد. بعد از ران شدن قسمت مربوط به ژل جدا شد و مطابق پروتکلکیت تخلیص انجام گردید(تصویر شماره ۲- ث).

ترانسفورماسیون به E. coli Top10F'

سلول‌های مستعد Top10F' با محصول لیگاسیون تحت شوک حرارتی قرار گرفتند. سپس در محیط LB بدون آنتی‌بیوتیک بازیابی شده و روی پلیت‌های+LB آمپی سیلین کشت داده شدند. کلنی‌های رشد یافته، نمایانگر باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب بودند(تصویر شماره ۳- الف).



تصویر شماره ۳: الف) محصول لیگاسیون به باکتری Top10 F ترانسفرم شد. .A: پلیت کنترل مثبت و منفی B : پلیت نمونه محصول لیگاسیونpET22b و ژن VEGF-COPGFP .. C: کشت ماتریکس از تک کلونی.

ب) انجام PCR با کلون های بدست آمده و پرایمر های T7 F و T7 R تست انجام گردید.

پ) تخلیص پلاسمید 1 : pET 22b - hVEGF-CopGFP الوشن ۱) ۲) الوشن ۲

ت) ترانسفرم وکتور pET 22b - hVEGF-CopGFP به باکتری BL-21.. A: پلیت نمونه pET22b حاوی ژن VEGF-COPGFP به باکتری BL-21. B : پلیت کنترل مثبت و منفی . C: کشت ماتریکس از تک کلونی.

کلونی PCR

برای انجام PCR از کلون های بدست آمده بعنوان نمونه استفاده شد و با پرایمر های T7 فوروارد و T7 ریورس تست انجام گردید. مشاهده باند ~۱۴۰۰ جفت‌بازی در کلون‌های منتخب، صحت درج قطعه ژن را تأیید کرد(تصویر شماره ۳- ب).

تخلیص پلاسمید کلون pET22b- CopGFP-hVEGF

همانند پروتکول کیت از کلون های بدست آمده که در محیط کشت TB Broth کشت داده شده است تخلیص پلاسمید انجام شد. کلون مثبت در محیط TB Broth کشت داده شد و تخلیص مجدد پلاسمید با استفاده از کیت انجام گرفت. محصول نهایی جهت ترانسفورماسیون به سویه بیانی استفاده شد (تصویر شماره ۳- پ).

ترانسفرم وکتور pET 22b - hVEGF-CopGFP به باکتری BL-21 (DE3)

پلاسمید تأییدشده به سلول‌های مستعد BL21 منتقل شد. کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک روی محیط انتخابی رشد کردند و برای بیان پروتئین استفاده شدند(تصویر شماره ۳- ت).

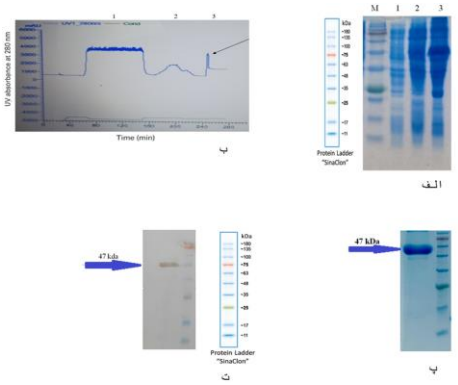
بیان پروتئین

هدف از این مرحله بررسی الگوی زمانی بیان پروتئین بود. کشت‌ها پس از برداشت، سانتریفیوژ شده، پلت‌ها در بافر لیز و سپس در SDS-PAGE بارگذاری شدند. نتایج نشان داد که بیشترین بیان در زمان Overnight رخ داده و در زمان ۳ ساعت نیز باند قابل مشاهده‌ای وجود دارد(تصویر شماره ۴- الف).

در کروماتوگرام به‌دست‌آمده سه پیک مجزا مشاهده شد و پیک‌های مشاهده‌شده مربوط به موارد زیر هستند: ۱) فلو-ترو(Flow-through) ؛ (۲) مرحله شست‌وشو (Washing)؛ (۳) پروتئین خالص‌شده (Eluted pure

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

(proteinمی‌باشند.. بیشترین جذب نوری در مرحله Elutionثبت شد که نشان‌دهنده حضور غلظت بالای پروتئین هدف بود(تصویر شماره ۴- ب).



تصویر شماره ٤: الف) بیان پروتئین در محیط کشت Terrific broth (TB). 1 نمونه قبل القا ۲ نمونه بعد القا. ساعت ۳. ۳ نمونه بعد از القا O/N باند حدود ۴۷ دالتن مشاهده شد.

ب) کروماتوگرام تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA و دستگاه FPLC .

پ) نمونه تخلیص پروتئین بدست آمده در ژل SDS-PAGE نشان داده شد.

ت) ژل مربوط به تست Western blot.

تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی افینیتی Ni-NTA با دستگاه FPLC

از نمونه حاصل از الوشن برروی ژل-SDS PAGEران شده و بر اساس نتایج، باند مشخصی در حوالی وزن مولکولی ۴۷ کیلو دالتون (kDa) مشاهده شد(تصویر شماره ۴-پ).

استفاده از مارکر پروتئینی امکان تخمین دقیق وزن باند مورد نظر را فراهم نمود. وضوح و شدت باند نیز نشانگر خلوص نسبی خوب نمونه تخلیص‌شده بود.

Western blot

نتایج وسترن بلات حضور باند مشخص در همان وزن مولکولی ۴۷ kDa را در نمونه‌های القاشده تأیید کرد و در نمونه‌های کنترل باندی مشاهده نشد. این نتیجه نشان می‌دهد که پروتئین بیان‌شده دقیقاً همان پروتئین نوترکیب مورد نظر است (VEGF-CopGFP-His-tag) و آلودگی با پروتئین‌های میزبان رخ نداده است(تصویر شماره ۴- ت).

پس از انتقال سازه نوترکیب pET22b-COP-GFP-hVEGF به سویه بیانی Escherichia coli BL21 (DE3)، بیان پروتئین فیوژن در محیط کشت Terrific Broth (TB) بررسی شد. پس از رسیدن کشت باکتریایی به تراکم مناسب، بیان پروتئین با افزودن IPTG القا گردید. نمونه‌برداری در سه مرحله شامل نمونه قبل از القا، نمونه ۳ ساعت پس از القا و نمونه پس از القای شبانه (Overnight) انجام شد.

بررسی الگوی پروتئینی نمونه‌ها با استفاده از SDS-PAGE نشان داد که پس از القای بیان، یک باند پروتئینی جدید با وزن مولکولی تقریبی ۴۷ کیلو دالتون در نمونه‌های القاشده مشاهده گردید؛ در حالی‌که این باند در نمونه قبل از القا مشاهده نشد یا شدت بسیار کمتری داشت. افزایش ظهور و شدت این باند پس از القا، بیان موفق پروتئین فیوژن نوترکیب COP-GFP-hVEGF در سویه E. coli BL21 (DE3) را تأیید نمود.

پس از بیان پروتئین، تخلیص پروتئین نوترکیب بر اساس وجود His-tag با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA و دستگاه FPLC انجام شد. کروماتوگرام حاصل از فرآیند تخلیص، جداسازی پروتئین هدف از سایر ترکیبات پروتئینی موجود در لیزات سلولی را نشان داد. پیک حاصل در مرحله الوشن، مربوط به خروج پروتئین‌های متصل‌شده به رزین Ni-NTA بوده و نشان‌دهنده موفقیت فرآیند تخلیص پروتئین نوترکیب بود.

بر اساس نتایج SDS-PAGE و کروماتوگرافی Ni-NTA، سیستم بیانی طراحی‌شده توانست پروتئین فیوژن COP-GFP-hVEGF را در میزبان پروکاریوتی E. coli BL21 (DE3) تولید و تخلیص نماید. با توجه به وجود بخش COP-GFP در ساختار فیوژن، این سازه علاوه بر تولید پروتئین هدف، قابلیت ردیابی و پایش بیان پروتئین از طریق ویژگی فلورسنتی را نیز دارا است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

در ایـن مطالعـه، ارزیـابی زیسـت‌فعالی پـروتئین نوترکیب انجام نشد؛ بنابراین برای تأیید عملکرد زیستی VEGF تولیدشده، انجام آزمون‌هـای عملکـردی شـامل بررسی اتصال بـه گیرنـده VEGFR، تحریـک تکثیـر یـا مهاجرت سلول‌های انـدوتلیال و آزمـون تشـکیل شـبکه عروقـی (Tube formation assay) در مطالعـات آینـده پیشنهاد می‌شود.

بحث

VEGF (Vascular Endothelial Growth actor) یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های فرآیند آنژیوژنز است کـه با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود، بـه‌ویژه VEGFR-1 و VEGFR-2، مسـیرهای پیام‌رسـانی در سـلول‌های اندوتلیال را فعال کرده و موجب افزایش تکثیر، مهـاجرت و بقای این سلول‌ها می‌شود. این فاکتور با افزایش نفوذپـذیری عروق، تشـکیل عـروق جدیـد و بازسـازی شـبکه عروقـی، نقش اساسی در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد جنینـی، ترمیم زخم و بازسازی بافت ایفا می‌کند. در مقابل، افـزایش بیان غیرطبیعـی VEGF در شـرایط پاتولوژیـک، بـه‌ویژه در تومورها، سبب ایجاد عروق جدید مورد نیـاز بـرای رشـد و متاستاز سـلول‌های سـرطانی مـی‌شـود و از ایـن رو بـه‌عنوان یکی از اهداف مهم در درمان‌های ضـد رگ‌زایـی شـناخته شده است(۱۳،۱۶).

عـلاوه بـر اهمیـت زیسـتی، VEGF و مشـتقات نوترکیـب آن دارای ارزش قابـل تـوجهی در حـوزه زیسـت‌فناوری و کاربردهـای صـنعتی هسـتند. تولیـد پـروتئین نوترکیـب VEGF امکـان انجـام مطالعـات عملکـردی، ارزیـابی برهم‌کنش‌هـای مولکـولی، توسـعه آزمون‌های تشخیصـی و بررسـی مسـیرهای سـیگنالینگ مرتبط با آنژیوژنز را فراهم می‌کند. همچنین پروتئین‌های نوترکیب خانواده VEGF در تحقیقات مهندسـی بافـت، پزشکی بازساختی و توسعه درمان‌های مبتنی بر تحریک رگ‌زایی مـورد توجـه قـرار گرفته‌انـد. بـه همـین دلیـل، توسعه سیستم‌های بیان اقتصادی و قابل توسعه برای تولید VEGF نوترکیـب، بـه‌ویژه در میزبان‌هـایی ماننـد Escherichia coli، اهمیت زیادی در تولید مقیاس‌های آزمایشگاهی و صنعتی پروتئین‌های زیستی دارد(۱۴).

امروزه سرطان یکی از مهم‌ترین چالش‌های جهـانی سلامت محسوب می‌شود و پیشرفت‌های حاصل‌شـده در دهه‌های اخیر، نتیجه سال‌ها تلاش برای شناسـایی دلایـل ناکامی روش‌های پیشین بـوده اسـت؛ موضـوعی کـه بـه توسـعه راهکارهـای درمـانی کارآمـدتر منجـر شـده است(۹). در این میان، رگ‌زایی توموری به‌عنوان یکـی از فرایندهای کلیدی در رشد و گسترش سـرطان، توجـه ویژه محققان و شرکت‌های داروسازی را به خـود جلـب کـرده اسـت. اگرچـه مسـیرهای مختلفـی در رگ‌زایـی دخیل‌اند، اما فاکتور رشد اندوتلیال عروقـی (VEGF) و گیرنده‌های آن از مهم‌ترین اهداف مطالعـاتی و دارویـی محسوب می‌شوند. افزایش سطح سرمی VEGF در انواع سرطان‌ها گزارش شده و گیرنـده‌های آن در سـلول‌های اندوتلیال فعـال، سـلول‌های غیرطبیعـی بافـت تومـوری و حتی به‌صورت نابجا در بسیاری از تومورهای جامد بیـان می‌شوند(۱۲-۱۰).

پژوهش حاضر با هدف کلونینـگ و بیـان پـروتئین نوترکیب VEGF انسـانی همـراه بـا ژن گزارشـگر cop-GFPدر سیستم بیان پروکاریوتی طراحـی شـد. انتخـاب این موضوع بر پایه دو ضرورت شکل گرفـت: نخسـت، نقـش کلیـدی VEGF در آنژیـوژنز، تـرمیم بافـت آسـیب‌دیده، بازسـازی عـروق و پیشـرفت سـرطان(۱۳)؛ دوم، اهمیت گزارشگرهای فلورسانس مانند cop-GFP در پایش غیرمخرب و دقیـق موفقیـت کلونینـگ و بیـان ژن. ایـن گزارشـگر، عـلاوه بـر تسـهیل غربـال‌گری کلون‌هـای مثبـت، امکـان بررسـی پایـداری پلاسـمید را فـراهم مـی‌کنـد. از سـوی دیگـر، انتخـاب میزبـان پروکاریوتی E. coli با توجه به رشد سریع، هزینـه کـم، سهولت دستکاری ژن و توان تولیـد مقیاس‌بـالا صـورت گرفـت؛ هرچنـد چالش‌هـایی از جملـه عـدم اصـلاح پس‌ترجمه‌ای و اجسام انکلوزیون(*inclusion body*) در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

این سیستم مطرح است(۱۵-۱۴). اهمیت بیان پروتئین‌های VEGF پیش‌تر نیز مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای توسط بهدانی و همکاران (۲۰۱۴)، پروتئین VEGFانسانی در وکتور pET26 کلون و در سویه BL21بیان شد و تخلیص آن از طریق کروماتوگرافی انجام گرفت(۳۲). مطالعات دیگر نیز با استفاده از وکتورهای pET در میزبان باکتریایی نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند که نشان‌دهنده مناسب بودن این بستر برای تولید VEGF است(۱۷-۱۶). مقایسه این گزارش‌ها با یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اگرچه سیستم پروکاریوتی فاقد برخی اصلاحات پس‌ترجمه‌ای است، اما مزایای سرعت، هزینه پایین و انعطاف‌پذیری بالا، همچنان آن را به گزینه‌ای مناسب برای بیان پروتئین‌های انسانی تبدیل کرده است(۱۷). به‌شرط کنترل دقیق دما، غلظت القاگر و زمان بیان، E. coliمی‌تواند پروتئین‌های زیست‌دارویی را با کارایی قابل قبول تولید کند(۱۸). در این پژوهش مراحل طراحی پرایمر، کلونینگ ژن VEGFهمراه با cop-GFP در وکتور مناسب و ترانسفورماسیون به سویه‌های منتخب E. coli با موفقیت انجام شد. مشاهده فلورسانس سبز تأییدکننده بیان GFP و به‌تبع آن بیان VEGF بودکه صحت عملکرد سازه نوترکیب را نشان داد. این امر ارزش استفاده از گزارشگرهای فلورسانس را به‌عنوان روشی سریع و غیرمخرب در پروژه‌های کلونینگ برجسته می‌سازد(۱۶).یکی از نقاط قوت اساسی پژوهش، تخلیص موفق پروتئین نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی بر پایه ستون Ni-NTA بود. کروماتوگرام FPLC نشان داد که پروتئین هدف در مرحله الوشن به‌طور مؤثر جدا شده و پروتئین‌های غیراختصاصی در مرحله شست شو حذف شده‌اند. عملکرد مناسب تگ هیستیدین نشان‌دهنده ترجمه کامل و صحیح پروتئین بود و خلوص حاصل‌شده امکان کاربرد در مراحل تحقیقاتی را فراهم کرد. این روش، نیاز به تکنیک‌های پیچیده‌تر را کاهش داد و راندمان مناسبی در تخلیص اولیه ایجاد نمود.ترکیب ژن VEGF با GFP یکی دیگر از ارزشمندترین جنبه‌های پژوهش حاضر بود. این استراتژی زمان و هزینه غربال‌گری را کاهش داد و دقت شناسایی کلون‌های مثبت را افزایش داد. استفاده از گزارشگرهای فلورسانس طی سال‌های اخیر در پروژه‌های بیان ژن رایج شده و نتایج ما نیز کارآمدی این رویکرد را تأیید کرد(۱۹). همچنین انتخاب وکتور مناسب و شرایط کشت بهینه در دستیابی به بیان موفق نقش اساسی داشت.با وجود موفقیت در بیان و تخلیص، چالش تشکیل اجسام انکلوزیون همچنان مطرح بود. اگرچه استفاده از دمای پایین، محیط غنی TB و تنظیم دقیق غلظت القاگر این مشکل را کاهش داد، اما بررسی انحلال‌پذیری پروتئین و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی می‌تواند اطلاعات بیشتری درباره وضعیت ساختاری آن فراهم کند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بهره‌گیری از شاپرون‌های مولکولی یا سویه‌های مهندسی‌شده E. coli می‌تواند میزان پروتئین فعال را افزایش دهد(۲۰).نتایج SDS-PAGE حضور باندی واضح در حدود ۴۷ کیلودالتون را نشان داد که مطابق وزن مولکولی پیش‌بینی‌شده پروتئین فیوژن VEGF-copGFP بود. آزمون Western blot نیز با استفاده از آنتی‌بادی ضد His این نتیجه را تأیید کرد و نشان داد که بیان به‌صورت اختصاصی و پایدار انجام شده است. تطابق نتایج SDS-PAGE و Western blotاثبات‌کننده صحت ساختار ژن، ترجمه کامل mRNA و پایداری پروتئین بیان‌شده بود. در کنار این یافته‌ها، ادغام ژن VEGF با GFP در مطالعات آتی می‌تواند به‌عنوان ابزاری ارزشمند برای ردیابی درون‌سلولی و in vivo استفاده شود. این ساختار نوترکیب بدون نیاز به رنگ‌آمیزی خارجی یا آنتی‌بادی، امکان بررسی زیست‌توزیع پروتئین را فراهم می‌سازد. چنین قابلیتی در طراحی بایوسنسورها، ردیابی دارو و مطالعات ژن‌درمانی اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده از این سازه در رده‌های سلولی و مدل‌های ایسکمیک

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

حیوانی می‌تواند دیدگاه‌های جدیدی در زمینه مهندسی بافت و پزشکی بازساختی ایجاد کند.اهمیتVEGFدر ایجاد عروق جدید و ترمیم بافت آسیب‌دیده،غ موجب شده است که بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی به‌طور مستقل به کلونینگ، بیان و تخلیص این پروتئین در سیستم‌های مختلف بپردازند. در پژوهش بهدانی و همکاران در سال ۲۰۱۴، پروتئین VEGF انسانی در وکتور pET26 کلون شد و در باکتری BL21 بیان گردید. سپس پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی خالص‌سازی شد. نتایج ما نشان می‌دهد که این رویکرد مشابه پژوهش ما در استفاده از وکتورهای سری pET و میزبان E. coli برای بیان VEGF است، که مناسب بودن این سیستم را برای این پروتئین تأیید می‌کند(۲۲-۲۱).

پژوهشWang و همکاران(۲۰۲۳) بر بیان و خالص‌سازی پروتئین VEGF انسانی در سیستم بیان یوکاریوتی مخمر (*Pichia pastoris*) تمرکز دارد. محققان با موفقیت مقادیر بالایی از VEGF نوترکیب را تولید کرده و فعالیت بیولوژیکی آن را در تحریک رشد سلول‌های اندوتلیال و تشکیل عروق اثبات نمودند. این مقاله از سیستم بیانی یوکاریوتی (Pichia pastoris) استفاده کرده که با سیستم پروکاریوتی (E. coli) در پژوهش ما متفاوت است. همچنین، به صراحت از ژن گزارشگر GFP همراه با VEGF در این مطالعه استفاده نشده است. با این حال، تأکید این مقاله بر اهمیت VEGFو پتانسیل آن در مهندسی بافت، یافته‌های کلی پژوهش ما را تقویت می‌کند و نشان می‌دهد که سیستم‌های بیانی مختلفی می‌توانند برای تولید VEGF فعال زیستی به کار روند(۲۳). پژوهش Kim و همکاران (۲۰۲۲) شباهت بسیار زیادی به پژوهش ما دارد. محققان یک سیستم بیانی باکتریایی (E. coli) برای VEGF طراحی کرده و آن را با یک برچسب فلورسنت مشابه (GFP) ادغام نموده‌اند تا شناسایی و جداسازی پروتئین نوترکیب را تسهیل کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که این رویکرد، غربالگری کلون‌های موفق را کارآمدتر کرده و به تولید VEGF با فعالیت زیستی مناسب منجر شده است. این مقاله به طور مستقیم استراتژی پژوهش ما را تقویت می‌کند، زیرا دقیقاً به کلونینگ و بیان VEGF در سیستم پروکاریوتی (E. coli) همراه با یک برچسب فلورسنت برای شناسایی بهتر پرداخته است. این رویکرد، مشابه استفاده ما از GFP برای تسهیل شناسایی کلون‌های بیان‌کننده VEGF است. تفاوت‌های جزئی ممکن است در نوع دقیق برچسب فلورسنت یا سویه باکتریایی مورد استفاده وجود داشته باشد(۲۴). پژوهش ژو و همکاران (۲۰۲۱) بر تولید VEGF نوترکیب در باکتری E. coli و ارزیابی اثربخشی آن در تسریع بهبود زخم‌های دیابتی تمرکز دارد. پروتئین VEGF با استفاده از وکتور pET-28b بیان و خالص‌سازی شده و سپس فعالیت درمانی آن در مدل‌های حیوانی بررسی گردیده است. این مقاله نیز تولید VEGF نوترکیب در E. coli و کاربرد درمانی آن را تقویت می‌کند. با این حال، این مطالعه به طور مشخص به استفاده از GFP برای غربالگری اشاره نکرده و تمرکز اصلی آن بر کاربرد درمانی خاص (بهبود زخم دیابتی) بوده است. بنابراین، از جنبه‌ی استراتژی غربالگری با ژن گزارشگر، با پژوهش ما متمایز است(۲۵). گروه‌های دیگر نیز پروتئین VEGFانسانی را در میزبان باکتریایی و با استفاده از وکتور pET بیان کرده‌اند. این مطالعات نیز تأیید می‌کنند که E. coli یک میزبان مناسب برای بیان پروتئین VEGF است، که این یافته با نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا می‌باشد. در مطالعات اخیر همچنین، استفاده از ژن‌های گزارشگر در پروژه‌های کلونینگ و بیان پروتئین رویکردی رایج شده است. در پژوهش حاضر، ادغام ژن گزارشگر GFP با ژن VEGF این امکان را فراهم آورد که بدون نیاز به آنتی‌بادی یا رنگ‌آمیزی خارجی، کلون‌های بیان‌کننده به‌راحتی شناسایی و از کلون‌های منفی تفکیک شوند. این استراتژی به‌طور چشمگیری زمان و هزینه‌های مربوط به تأیید بیان پروتئین نوترکیب را کاهش داد و دقت و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

اطمینان نتایج را افزایش داد(۲۶). مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که VEGF نوترکیب می‌تواند نقش مؤثری در تحریک آنژیوژنز و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده ایفا کند. پژوهش ما نیز برای تولید VEGF نوترکیب در باکتری، پتانسیل کاربردهای گسترده‌ای را در مهندسی بافت، پزشکی بازساختی و درمان بیماری‌های ایسکمیک فراهم می‌آورد(۲۷).

درجمع‌بندی، پژوهش حاضر نشان داد که کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب VEGF همراه با cop-GFP در سیستم پروکاریوتی با موفقیت انجام شد. این نتایج مسیر مناسبی براین تولید سازه‌های مشابه در آینده ارائه می‌دهد و نشان می‌دهد که بهره‌گیری از ژن‌های گزارشگر می‌تواند به‌عنوان ابزاری قدرتمند در تسهیل فرایندهای کلونینگ، بیان و غربال‌گری مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود درگام‌های بعدی، بیان در مقیاس بیورآکتوری، خالص‌سازی پیشرفته و ارزیابی زیست‌فعالی پروتئین در مدل‌های سلولی و حیوانی صورت گیرد تا مسیر تجاری‌سازی و کاربرد درمانی این محصول هموار شود. بررسی ویژگی‌های عملکردی شامل توان آنژیوژنیک و نیمه‌عمر پروتئین در سرم نیز از مراحل ضروری در توسعه این پروتئین نوترکیب خواهد بود.

سپاسگزاری

از کلیه همکارانی که در اجرای این طرح پژوهشی همکاری نموده اند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

1- 1. Singh H, Rohilla R, Jaswal S, Singla M. Comparison of teneligliptin and other gliptin-based regimens in addressing insulin resistance and glycemic control in type 2 diabetic patients: a cross-sectional study. Expert Rev Endocrinol Metab 2024; 19(1): 81-87. PMID: 38085247

2- 2. Jaberi M, Asadi E. Relationship between serum leptin and insulin resistance among obese Iranian women. New Cell Mol Biotechnol J 2023; 13(52): 23-32.

3- Scheen AJ, Lefèbvre PJ. Glucagon, from past to present: a century of intensive research and controversies. Lancet Diabetes Endocrinol 2023; 11(2): 129-138. PMID: 36566754

4- Wang F, Han L, Hu D. Fasting insulin, insulin resistance and risk of hypertension in the general population: a meta-analysis. Clin Chim Acta 2017; 464: 57-63. PMID: 27836689

5- Smith PJ, Mabe S, Sherwood A, Babyak MA, Doraiswamy PM, Welsh-Bohmer KA, et al. Association between insulin resistance, plasma leptin, and neurocognition in vascular cognitive impairment. J Alzheimers Dis 2019; 71(3): 921-929. PMID: 31476159

6- Tofangchiha S, Rahimi S, Mirzaii-Dizgah I, Isazadeh M, Mansournia N, Taghavi Y, et al. The relationship between serum resistin levels and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. Ann Mil Health Sci Res 2020; 18(4): e107878.

7- Kjeldsen SAS, Werge MP, Grandt J, Richter MM, Thing M, Hetland LE, et al. Hepatic steatosis—and not type 2 diabetes, body mass index, or hepatic fibrosis—associates with hyperglucagonemia in individuals with steatotic liver disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2024; 327(4): G558-G570. PMID: 39104323

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

8- Merkhassine M, Coch RW, Frederick CE, Bennett LL, Peng SA, Morse B, et al. Glucagon infusion alters the circulating metabolome and urine amino acid excretion in dogs. J Endocrinol 2024; 262(2): e240051. PMID: 38814331

9- Armour SL, Stanley JE, Cantley J, Dean ED, Knudsen JG. Metabolic regulation of glucagon secretion. J Endocrinol 2023; 259(1): e230081. PMID: 37523232

10- Kim J, Okamoto H, Huang Z, Anguiano G, Chen S, Liu Q, et al. Amino acid transporter Slc38a5 controls glucagon receptor inhibition-induced pancreatic α cell hyperplasia in mice. Cell Metab 2017; 25(6): 1348-1361.e8. PMID: 28591637

11- Yamakage H, Jo T, Tanaka M, Kato S, Hasegawa K, Masuda I, et al. Five percent weight loss is a significant 1-year predictor and an optimal 5-year cut-off for reducing the number of obesity-related cardiovascular disease risk components: the Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study. Front Endocrinol (Lausanne) 2024; 15: 1343153. PMID: 38577577.

12- Fadini GP, Morieri ML, Longato E, Bonora BM, Pinelli S, Selmin E, et al. Exposure to dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors and COVID-19 among people with type 2 diabetes: a case-control study. Diabetes Obes Metab 2020; 22(10): 1946-1950. PMID: 32627273

13- Yin R, Xu Y, Wang X, Yang L, Zhao D. Role of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in antidiabetic treatment. Molecules 2022; 27(10): 3055. PMID: 35630534

14- Khamseh ME, Sepanlou SG, Hashemi-Madani N, Joukar F, Mehrparvar AH, Faramarzi E, et al. Nationwide prevalence of diabetes and prediabetes and associated risk factors among Iranian adults: analysis of data from PERSIAN Cohort Study. Diabetes Ther 2021; 12(11): 2921-2938. PMID: 34508302.

15- Shukohifar M, Mozafari Z, Rahmanian M, Mirzaei M. Performance of body mass index and body fat percentage in predicting metabolic syndrome risk factors in diabetic patients of Yazd, Iran. BMC Endocr Disord 2022; 22(1): 216. PMID: 36045375

16- Kretschmer M, Rüdiger D, Zahler S. Mechanical aspects of angiogenesis. Cancers (Basel) 2021; 13(19): 4987. PMID: 34638470

17- Shaw P, Dwivedi SKD, Bhattacharya R, Mukherjee P, Rao G. VEGF signaling: role in angiogenesis and beyond. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2024; 1879(2): 189079. PMID: 38280470

18- Bhatwa A, Wang W, Hassan YI, Abraham N, Li XZ, Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli and strategies to address them for industrial applications. Front Bioeng Biotechnol 2021; 9: 630551. PMID: 33644021.

19- Zhou L, Ma Y, Wang K, Chen T, Huang Y, Liu L, et al. Omics-guided bacterial engineering of Escherichia coli ER2566 for recombinant protein expression. Appl Microbiol Biotechnol 2023; 107(2-3): 853-865. PMID: 36539564

20- Muñoz-Solórzano L, Willis-Ureña K, Valverde-Rojas S, Jarquín-Cordero M, Barboza-Fallas L. Microalgae as expression systems for recombinant protein production. Rev Tecnol Marcha 2024; 37(9): 32-47.

21- Petrosyan A, Martins PN, Solez K, Uygun BE, Gorantla VS, Orlando G. Regenerative

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]

medicine applications: an overview of clinical trials. Front Bioeng Biotechnol 2022; 10: 942750. PMID: 36507264

22- Chen YL, Xie XX, Zhong N, Sun LC, Lin D, Zhang LJ, et al. Research progresses and applications of fluorescent protein antibodies: a review focusing on nanobodies. Int J Mol Sci 2023; 24(5): 4307. PMID: 36901737

23- Folkman J. Angiogenesis. Annu Rev Med 2006; 57: 1-18. PMID: 16409133

24- Shaw P, Dwivedi SKD, Bhattacharya R, Mukherjee P, Rao G. VEGF signaling: role in angiogenesis and beyond. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2024; 1879(2): 189079. PMID: 38280470

25- Wang L, Li Y, Chen X, Zhang W. Enhanced expression and functional characterization of recombinant human VEGF in Pichia pastoris for tissue engineering applications. Mol Biotechnol 2023; 65(4): 567-578.

26- Kim S, Park J, Lee H, Choi Y. Development of a bacterial expression system for VEGF: fusion with a fluorescent tag for improved detection. Microb Cell Fact 2022; 21(1): 145.

27- Zhou P, Liu Y, Zhao K, Sun J. Recombinant VEGF production in E. coli and its efficacy in accelerating diabetic wound healing. J Diabet Complicat 2021; 35(8): 107951.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-16]