

Evaluation and comparison of affinity chromatography and precipitation– based methods on purification of recombinant streptokinase

Masoud Seyedinkhorasani¹, Malihe Keramati², Reza Ahangari Cohan³, Farzin Roohvand⁴, Dariush Norouzian⁵

¹ PhD Student of Pharmaceutical Biotechnology, Nano-biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran

² Assistant Professor, PhD of Pharmaceutical Biotechnology, Nano-biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran

³ Associate Professor, PhD of Pharmaceutical Biotechnology, Nano-biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, PhD of Medical Biotechnology, Virology Department, Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran

⁵ Professor, PhD of Biochemistry, Nano-biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran

Abstract

Background: Increase of protein purity is a serious challenge in the production of recombinant therapeutic proteins. For this purpose, several strategies have been employed to purify the target protein, among which the affinity chromatography-based purification methods and tagged proteins such as Ni-NTA are common and but costly. Therefore column-free purification techniques, such as using elastin-like proteins (ELPs), are being developed as alternative method. In present study, the efficacy of Ni-NTA, ELP, and the combined Ni-NTA/ELP was evaluated for purification of streptokinase as a model protein at lab scale.

Materials and methods: Streptokinase gene was amplified by PCR, cloned into pET21-ELP, and transformed into *E.coli* BL21 Rosetta cell. The expressed protein was then purified using the methods described above. The identity and purity of the protein were evaluated by western blot using Anti-His antibody and SDS-PAGE, respectively. The purification yield was also calculated for each method by micro-Bradford assay.

Results: The purification yield was calculated as 76 ± 16 $\mu\text{g/ml}$ in ELP precipitation, 108 ± 14 $\mu\text{g/ml}$ in Ni-NTA purification and 88 ± 11 $\mu\text{g/ml}$ in Ni-NTA/ELP combined method, respectively. The SDS-PAGE results showed that the purity of streptokinase purified by the combined method was higher than that of each method separately.

Conclusion: The present study showed that the integration of purification methods in one step can increase the purity and yield in purification process of recombinant therapeutic proteins.

Keywords: ELP, Elastin like polypeptide, Protein purification, Column-free purification, Streptokinase.

Cited as: Seyedinkhorasani M, Keramati M, Ahangari Cohan R, Roohvand F, Norouzian D. Evaluation and comparison of affinity chromatography and precipitation – based methods on purification of recombinant streptokinase. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): 387-395.

Correspondence to: Malihe Keramati & Dariush Norouzian

Tel: +98 02164112168

E-mail: keramatim@pasteur.ac.ir & dnsa@pasteur.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-7196-8751 & 0000-0002-9597-3555

Received: 1 Sep 2019; **Accepted:** 6 Feb 2020

بررسی و مقایسه روش‌های مبتنی بر رسوب دهی و کروماتوگرافی تمایلی در تخلیص پروتئین نو ترکیب استرپتوکیناز

مسعود سیدین خراسانی^۱، ملیحه کرامتی^۲، رضا آهنگری کهن^۳، فرزین روحوند^۴، داریوش نوروزیان^۵

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران، ایران
^۲ استادیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران، ایران
^۳ دانشیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران، ایران
^۴ دانشیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، بخش ویروس شناسی، تهران، ایران
^۵ استاده، دکتری تخصصی بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تخلیص پروتئین با بازده و خلوص بالا چالشی جدی در تهیه پروتئین‌های نو ترکیب دارویی است. از بین استراتژی‌های تخلیص پروتئین هدف، روش‌های تخلیص بر پایه کروماتوگرافی تمایلی مانند Ni-NTA بسیار پرکاربرد و در عین حال هزینه‌بر هستند. روش‌های تخلیص مستقل از ستون، مانند استفاده از پروتئین‌های شبیه به الاستین (ELP)، به عنوان روش‌های جایگزین در حال توسعه هستند. در این تحقیق، کارایی استفاده از رزین نیکل، ELP و ترکیب آنها (ELP/Ni-NTA) در تخلیص پروتئین استرپتوکیناز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: ژن استرپتوکیناز توسط PCR تکثیر، در پلازمید pET21 کلون و به سلول E.coli-Rosetta ترانسفرم شد. پروتئین آن بیان و تخلیص شد سپس ماهیت و خلوص پروتئین به ترتیب توسط وسترن بلات و SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. بازده خلوص سازی در هریک از روش‌های تخلیص با میکروبرادفورد محاسبه شد.

یافته‌ها: بازده خلوص سازی ELP-SK-His با استفاده از ستون Ni-NTA به مقدار $14 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ و ELP به مقدار $16 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ و ELP/Ni-NTA به مقدار $11 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. نتایج رنگ آمیزی و وسترن بلات نشان داد که کیفیت خلوص پروتئین خالص شده با ELP/Ni-NTA بیشتر از روش ELP و Ni-NTA به تنهایی بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که ادغام روش‌های خالص سازی در یک مرحله می‌تواند باعث افزایش خلوص و بازده محصول نهایی در تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی شود.

واژگان کلیدی: پلی پپتیدهای شبیه الاستین، تخلیص پروتئین، استرپتوکیناز، تخلیص مستقل از ستون.

مقدمه

جداسازی و تخلیص پروتئین یک فرآیند اساسی و مورد نیاز برای بسیاری از مطالعات بیولوژیکی است. جداسازی پروتئین‌های مطلوب با بیشترین مقدار ممکن، بالاترین میزان

خلوص و بیشترین فعالیت بیولوژیکی برای بسیاری از مطالعات بیولوژیکی و کاربردهای درمانی ضروری است. در صنعت نیز بیشترین هزینه تولید یک محصول به جداسازی و تخلیص پروتئین اختصاص می‌یابد، به گونه‌ای که بین ۴۵ تا ۹۰ درصد هزینه فرآیندهای پایین دستی را به خود اختصاص می‌دهد (۱). به همین منظور از روش‌ها و استراتژی‌های متنوعی برای تخلیص پروتئین هدف از سایر پروتئین‌های غیراختصاصی و ناخالصی‌های محیط کشت و سلول‌های میزبان به کار گرفته

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش نانوبیوتکنولوژی، ملیحه کرامتی،
داریوش نوروزیان (email: keramatim@pasteur.ac.ir & dnsa@pasteur.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-7196-8751 & 0000-0002-9597-3555
تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۶/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۱/۷

می‌شود تا با کمترین هزینه به بیشترین مقدار محصول نهایی با بالاترین میزان خلوص و فعالیت بیولوژیکی دست یافت (۴-۱). در حال حاضر از روش‌های تخلیص پروتئین رایج می‌توان به روش‌هایی همچون روش‌های رسوبی بر پایه استفاده از غلظت‌های نمکی، روش‌های بر پایه کروماتوگرافی شامل کروماتوگرافی غربالگری اندازه (Size exclusion chromatography)، کروماتوگرافی فاز معکوس بر اساس آب‌گریزی (Hydrophobicity)، کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion exchange chromatography)، کروماتوگرافی تمایلی (Affinity chromatography) اشاره کرد (۳-۱، ۵، ۶). اغلب روش‌های تخلیص پروتئین بر پایه کروماتوگرافی عموماً روش‌هایی زمان‌بر و پرهزینه‌اند که نیاز به مراحل آماده‌سازی متعدد نمونه قبل از فرآیند تخلیص دارند (۶، ۷). با این وجود کروماتوگرافی تمایلی به دلیل اختصاصیت در بسیاری از پروتکل‌های خالص‌سازی لحاظ می‌شود. سیستم‌های ساده‌تر آن بر پایه استفاده از دنباله‌های دارای لیگاند است. تخلیص پروتئین بر پایه His-tag/Ni-NTA روشی سریع، کارآمد و پرکاربردترین سیستم برای تخلیص پروتئین بر اساس برچسب/ کروماتوگرافی تمایلی محسوب می‌شود (۷، ۸).

تخلیص پروتئین بر پایه His-tag/Ni-NTA علی‌رغم سادگی و کارایی با محدودیت‌هایی از قبیل وجود ناخالصی‌های پروتئینی به دلیل مشابهت توالی‌های ذاتی پروتئین‌های میزبان با دنباله هیستیدینی نیز روبرو است. بنابراین توسعه روش‌های نوین و یا ترکیبی روش‌هایی جهت کارآمدی موثرتر روش ساده و قابل دسترسی مانند His-tag/Ni-NTA ضروری به نظر می‌رسد (۸). پلی‌پپتیدهای شبیه به الاستین (ELPs) بیوپلیمرهای مصنوعی سنتتیک هستند که به واسطه ساختار ویژه‌ای که دارند دارای کاربردهای بیولوژیکی متفاوتی در زمینه‌های مهندسی بافت، درمان سرطان، دارورسانی و تخلیص پروتئین هستند. اصلی‌ترین ویژگی ELP توانایی آنها در تشکیل رسوب برگشت پذیر در شرایط تغییر دما است، به این صورت که با تغییر دما ELP از ساختار مارپیچ‌های محلول در آب به رسوب‌های نامحلول تغییر وضعیت می‌دهد (۵، ۹). از همین ویژگی تشکیل رسوب برگشت پذیر به عنوان روشی جهت تخلیص پروتئین هدف استفاده شده است. بدین ترتیب که با اتصال پروتئین هدف به ELP و سپس تغییر دما و رسوب آن در شرایطی که سایر پروتئین‌های موجود به صورت محلول هستند، پروتئین هدف با سانتریفیوژ کردن جداسازی می‌شود. ساختار پلیمرهای ELP رایج دارای یک ساختار تکرار شونده پنج اسید آمینه هستند که مونومرهای آن عموماً از الگوی (Val-Pro-Gly-Xaa-Gly)_n

پیروی می‌کنند. در این ساختار n تعداد تکرارهای پنج اسید آمینه ای را مشخص می‌کند و Xaa می‌تواند هر اسیدآمینه‌ای باشد، به غیر از اسید آمینه پرولین که مانع از رسوب ELP می‌شود. در این ساختار گلیسین به دلیل نداشتن یک زنجیره جانبی بزرگ باعث می‌شود بیوپلیمر انعطاف پذیر باشد و پرولین مانع از تشکیل پیوند هیدروژنی پایدار در ساختار ELP می‌شود. سایر انواع پلیمری ELP با ساختارهای متفاوت نیز توسعه یافته‌اند که در توالی تکرار شونده خود مانند (IPGVG) و یا در تعداد توالی تکرار شونده خود مانند (LGAGGAG) و (LGAGGAGVL) متفاوت هستند. به دمایی که ELP از حالت محلول به حالت نامحلول در می‌آید، دمای گذار گفته می‌شود (T_t)، به گونه‌ای که در دمای بالاتر از دمای گذار ELP به حالت نامحلول و در دمای پایین‌تر از دمای گذار ELP به صورت محلول است. همچنین این دما به واسطه ماهیت پروتئین متصل شده به ELP و آب‌گریزی و باردار یا بدون بار بودن اسید آمینه جایگاه Xaa متغیر خواهد بود (۱۳-۱۰).

در تحقیق حاضر پروتئین Streptokinase (SK) از باکتری *Streptococcus equisimilis* که دارای خواص ضد انعقادی است و یک داروی ترومبولیتیک است (۱۴)، به عنوان یک مدل دارویی جهت تخلیص با ELP با ساختار (Val-Pro-Gly-Xaa-₁₅₀Gly) کلون و بیان شده و با استفاده از دو روش ELP، Ni-NTA و ترکیب این روش‌ها با یکدیگر جداسازی شد و کارایی هر کدام از این روش‌ها در مقدار پروتئین تخلیص شده و کیفیت خلوص محصول نهایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

ساخت سازه‌های ژنی

قطعه ژنی SK از DNA ژنومیک باکتری *Streptococcus equisimilis* ATCC 9542 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر شد و پس از برش با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* درون پلاسمید pET21a-ELP (اهدایی دکتر Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The Ohio State University, Columbus, Ohio) کلون شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ژن SK در جایگاه انتهای N (N Terminal) به ELP و در جایگاه انتهای C (C Terminal) به His-Tag متصل شد و بین ELP و SK جایگاه برش آنزیمی برای آنزیم پروتئاز Factor Xa قرار گرفت. پلاسمید pET21a-ELP-SK-His با PCR و هضم

آنزیمی توسط آنزیم های *XhoI* و *NdeI* تایید شد (شکل ۲). سپس با استفاده از شوک حرارتی در باکتری *E. coli* BL21 (Invitrogen™) Rosseta (DE3) ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های مطلوب با استفاده از پلیت حاوی محیط کشت 2XYT و آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی 50 µg/mL انجام شد. سپس کلونی‌های رشد کرده، ابتدا به 5 میلی لیتر و سپس به 500 میلی لیتر محیط مایع 2XYT حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین 50 µg/mL انتقال داده شد و پس از انکوباسیون و رسیدن به دانسیته نوری 0/6 بیان پروتئین توسط IPTG با غلظت نهایی 0/8 mM القاء شد. باکتری‌های القاء شده به مدت 16 ساعت در دمای 22 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (120 دور در دقیقه) نگهداری شدند. سپس با استفاده از سانتریفیوژ در دمای 4 درجه در 15000 دور در دقیقه باکتری‌های القاء شده رسوب گیری شدند.

تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از تغییر غلظت نمک و تغییر دما

توده باکتریایی رسوب داده شده در بافر PBS (phosphate buffered saline) حل و سپس شکست سلولی با سونیکاسیون به مدت 15 دقیقه (Amplitude 60, 15 sec on, 30sec off) روی یخ انجام شد. سپس محلول لیز سلولی به دست آمده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه در 15000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل جداسازی و به مدت 10 دقیقه در حمام آب 30 درجه همزده شد. سپس محلول نمک NaCl با غلظت 5M تا زمان نمایان شدن رسوبات ابری شکل نامحلول به صورت قطره‌ای به آن اضافه شد. رسوبات نامحلول به دست آمده با سانتریفیوژ (15000 دور در دقیقه، دمای 30 درجه سانتی‌گراد، 10 دقیقه) جداسازی و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در بافر PBS حل شد. به منظور افزایش میزان خلوص مراحل تخلیص ذکر شده تا سه بار تکرار شد سپس پروتئین تخلیص شده نهایی با استفاده از SDS-PAGE و میکروبرادفورد جهت تعیین کیفیت و کمیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA

پس از تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از سونیکاسیون (Amplitude 60, 15 sec on, 30sec off) لیزت سلولی به دست آمده سانتریفیوژ شد (15000g, 10min). سپس محلول رویی از روی ستون حاوی رزین های Ni-NTA عبور داده شد. پس از عبور محلول لیزت سلولی سه مرحله شستشو با استفاده از 5ml بافر PBS حاوی mM

Imidazole 20 انجام شد. در نهایت با استفاده از بافر PBS حاوی 800mM Imidazole پروتئین‌های متصل به ستون جداسازی و تخلیص شد و در نهایت با استفاده از SDS-PAGE و میکرو برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین با استفاده از Ni-NTA/ELP

پس از تخلیص ELP-SK-His با استفاده از ستون حاوی رزین Ni-NTA که به واسطه His-Tag انجام شد. محصول تخلیص شده به واسطه ELP متصل به آن با استفاده از رسوبدهی با تغییر غلظت نمک و دما دوباره خالص سازی شد.

SDS-PAGE و وسترن بلات

به منظور ارزیابی کیفیت تخلیص در هر سه روش، الکتروفورز ژل اکریلامید انجام شد. به این ترتیب که مقدار 10 µL از نمونه‌های تخلیص شده با بافر لودینگ حاوی 2-mercaptoethanol مخلوط و پس از جوشاندن و در ژل SDS-PAGE 10٪ بارگذاری شد و در ادامه رنگ آمیزی کماسی بلو (G250) انجام شد. تعیین هویت پروتئین‌های تخلیص شده با وسترن بلات و استفاده از آنتی بادی کونژوگه (HRP-Conjugated anti-His-tag monoclonal antibody) علیه His-Tag و سوبسترای 3,3-diaminobenzidine (DAB) انجام شد.

غلظت سنجی پروتئین با تست میکرو برادفورد (Micro-Bradford assay)

تست برادفورد طبق پروتکل‌های استاندارد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA (bovine serum albumin) به عنوان استاندارد با غلظت‌های (0/5-60 µg/ml) انجام شد (15).

یافته‌ها

نتایج تایید ژن SK کلون شده در pET21a-ELP با

هضم آنزیمی و PCR

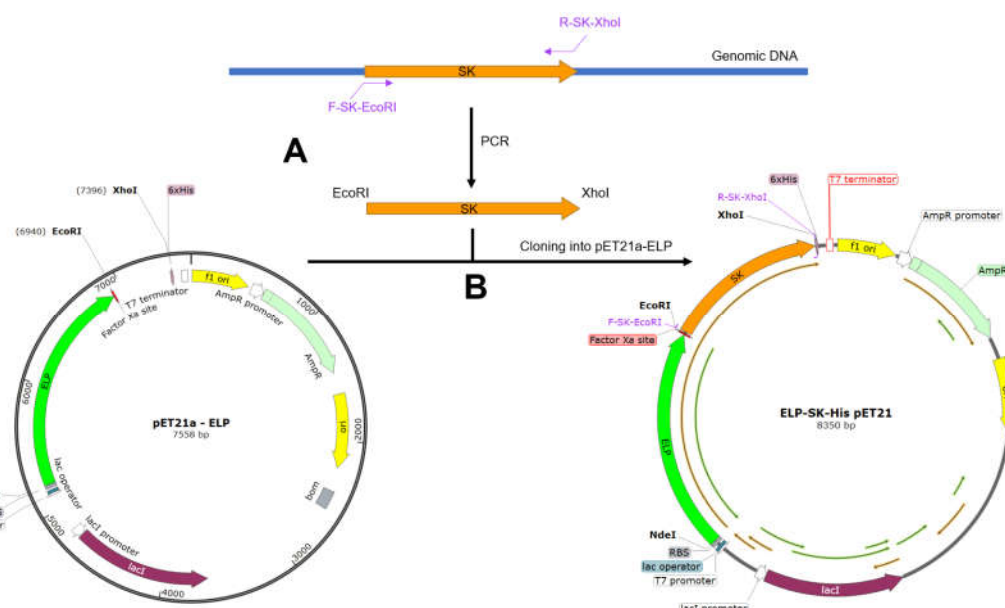
همان طور که در شکل 2 نشان داده شده است پلاسمید pET21a-ELP-SK-His کلون شده با استفاده از PCR و هضم آنزیمی تایید شد. باند 1261bp تکثیر ژن SK را توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی جدول 1 را نشان می‌دهد. مطابق آنچه در شکل 2 نشان داده شده است اندازه قطعات برش خورده شده حاصل از هضم آنزیمی pET21a-ELP-SK-His با آنزیم های *XhoI* و *NdeI* کلونینگ ژن SK را تایید کرد.

جدول ۱. توالی پرایمر های تکثیر SK

نام پرایمر	توالی پرایمر
R-SK- <i>Xho</i> I	ATATCTCGAGTTTGTGCGTTAGGGTTATCACG
F-SK- <i>Eco</i> RI	ATAGAATTCATTGCTGGACCTGAGTG

جدول ۲. میزان پروتئین استخراج شده با استفاده از ELP و رزین Ni-NTA

روش تخلیص	تخلیص اول	تخلیص دوم	تخلیص سوم
ELP-based	۷۶±۱۶ µg/ml	۷۱±۱۱ µg/ml	۶۹±۱۳ µg/ml
Ni-NTA resin	۱۰۸±۱۴ µg/ml	-	-
Ni-NTA/ELP	۸۸±۱۱ µg/ml	-	-



شکل ۱. مراحل کلونینگ ژن SK در وکتور pET21a-ELP (A) تکثیر ژن SK با استفاده از پرایمر های اختصاصی از DNA ژنومی باکتری SP (B) برش قطعه تکثیر شده و کلون آن در وکتور pET21a-ELP

نتایج تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA و

Ni-NTA/ELP

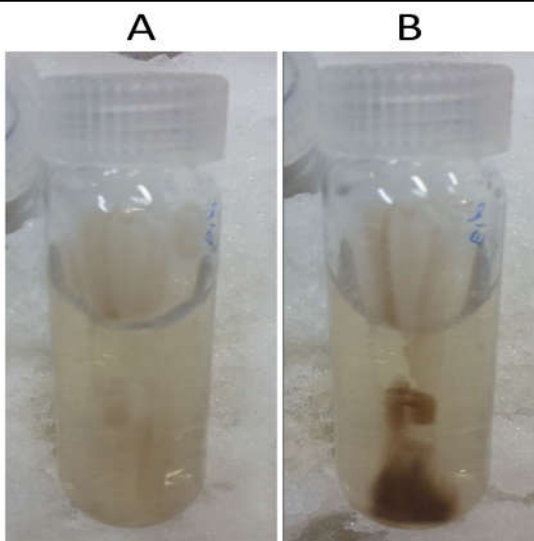
ELP-SK-His با استفاده از ستون حاوی Ni-NTA تخلیص شد سپس با استفاده از ELP مراحل خالص سازی بیشتر روی آن انجام شد که نتایج SDS-PAGE تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از ستون حاوی رزین Ni-NTA و ELP/Ni-NTA (در ترکیب با یکدیگر نمایش) در شکل ۵ داده شده است. باند پروتئینی معادل ۹۵ kDa بیانگر پروتئین ELP-SK-His خالص سازی شده است. باند پروتئینی ۹۵kDa توسط وسترن بلات نشان داده شد که بیانگر صحت پروتئین ELP-SK-His تخلیص شده با هر دو روش Ni-NTA و ELP است. مقدار پروتئین تخلیص شده با استفاده از هر دو روش Ni-NTA و ELP با استفاده

نتایج تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از

تغییر غلظت نمک و تغییر دما

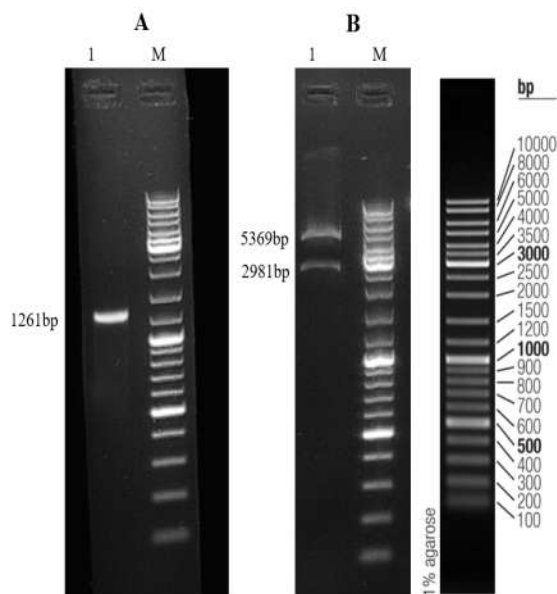
شکل ۳ نشان دهنده نتایج سه مرحله تخلیص با استفاده از تغییر دما و تغییر غلظت نمک NaCl بیانگر کاهش مقدار باندهای پروتئینی غیر اختصاصی با افزایش مراحل تخلیص است.

همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است پروتئین ELP-SK-His در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و افزایش غلظت نمک NaCl به صورت نامحلول و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و کاهش غلظت نمک NaCl به صورت محلول مشاهده می شود.

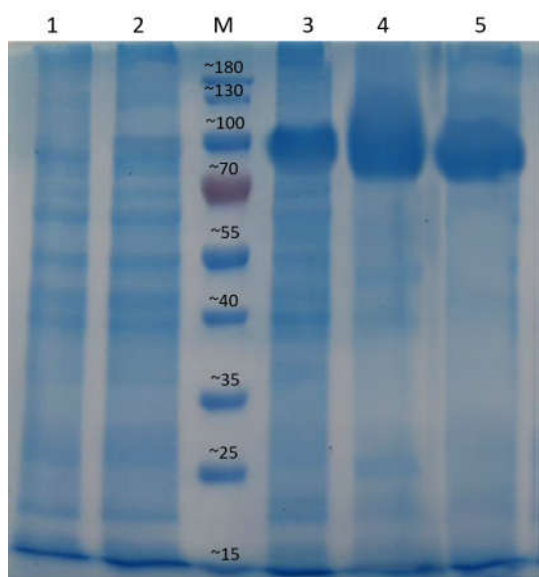


شکل ۴. تخلیص ELP-SK-His با استفاده از دما ۳۰ درجه و نمک NaCl (A) فاز محلول ELP-SK-His در دمای ۴ درجه و غلظت کم نمک (B) فاز نامحلول ELP-SK-His (رسوب تیره رنگ) در دمای ۳۰ درجه و غلظت بالای نمک NaCl.

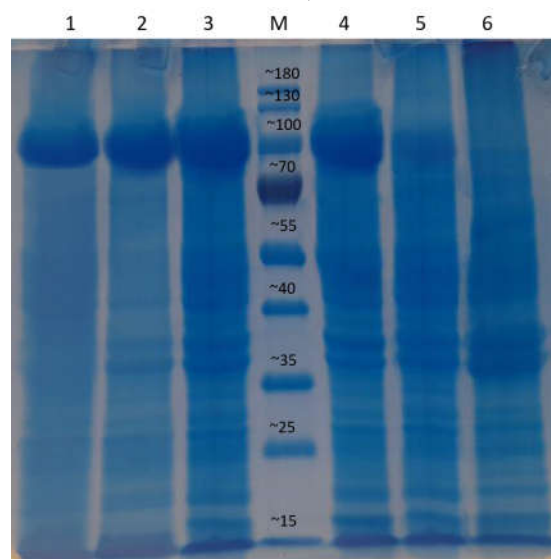
از میکرو برادفورد سنجیده شد و نتایج آن در Error! Reference source not found. نشان داده شده است.



شکل ۲. نتایج تایید کلونینگ ژن SK با PCR و هضم آنزیمی (A) ژل آگارز مربوط به PCR پلاسمید pET21a-ELP-SK-His با پرایمرهای اختصاصی جدول ۱ (B) نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pET21a-ELP-SK-His با آنزیم های *XhoI* و *NdeI*

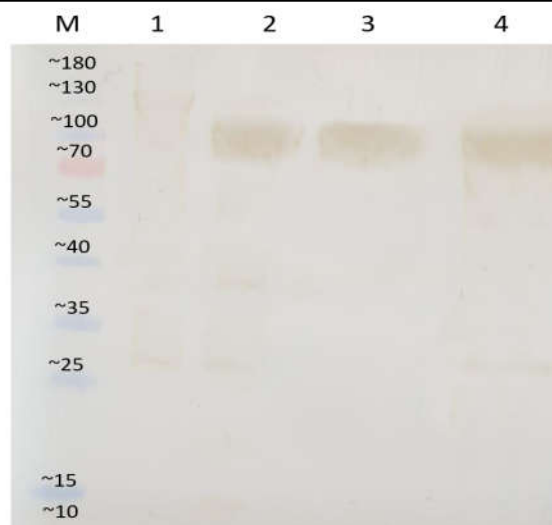


شکل ۵. تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از ستون Ni-NTA و ترکیبی Ni-NTA/ELP (۱) محتوی پروتئین باکتری *E.coli* Rosseta BL21 فاقد پلاسمید (۲) محتوی پروتئین باکتری قبل از القاء بیان (۳) محتوی پروتئین باکتری پس از القاء بیان (۴) حاصل تخلیص محتوی پروتئین باکتری توسط ستون حاوی رزین Ni-NTA (۵) حاصل تخلیص در روش ترکیبی Ni-NTA/ELP



شکل ۳. تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از نمک و دمای ۳۰ درجه؛ (۱) حاصل تخلیص نهایی پس از سه بار تکرار مراحل تخلیص، (۲) حاصل تخلیص نهایی پس از دو بار تکرار مراحل تخلیص، (۳) حاصل تخلیص نهایی پس از یک بار تکرار مراحل تخلیص، (۴) محتوی پروتئین سلولی پس از القاء بیان، (۵) محتوی پروتئین سلولی قبل از القاء بیان، (۶) محتوی پروتئین باکتری *E.coli* BL21 Rosseta فاقد پلاسمید

روش‌های تخلیص پروتئین نیز استفاده کرد (۹، ۱۶، ۱۷). Wood و همکارانش تخلیص پ پروتئین هدف با استفاده از ELP و اینتئین (Intein) را با استفاده از استراتژی‌های گوناگونی مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج آنها نیز نشان می‌دهد که ترکیب تخلیص با استفاده از ELP و اینتئین منجر به تخلیص پروتئین هدف با خلوص و مقدار بالا می‌شود. Wood و همکارانش روشی با عنوان Dual ELP Split Intein شامل دو جز جدا از هم اینتئین که هر یک متصل به ساختار ELP است را جهت افزایش میزان خلوص مورد استفاده قرار دادند (۵، ۹). در تحقیقی دیگر با متصل کردن یک اینتئین Continues به ELP روشی تک مرحله‌ای برای تخلیص پروتئین با خلوص بالا بدون برچسب تمایلی معرفی شده است (۱۲). در ادامه بهبود این روش‌ها بررسی میزان غلظت نمک، دما و شرایط بیان پروتئین نیز نشان داد که استفاده از ELP در یک سیستم تخلیص پروتئین می‌تواند بسیار به صرفه اقتصادی باشد (۱۷، ۱۸). در تحقیقی دیگر Heejae Kim و همکارانش از ELP در ترکیب با تگ SH3 جهت تخلیص GFP استفاده کردند که نتایج آنها نشان دهنده خلوص بالای GFP خالص شده است (۱۹). اخیراً نیز Carolyn E.mills و همکارانش روشی تک مرحله بر اساس ELP با استفاده از اتانول و تغییر غلظت نمک را به منظور تخلیص پروتئین sfGFP به کار بردند. اهمیت روش این است که بسیار انتخابی است و بیشترین تاثیر را روی رسوب دهی ELP و پروتئین متصل به آن دارد، در نتیجه موجب افزایش میزان خلوص پروتئین هدف می‌شود. ویژگی دیگر این روش این است که نسبت به روش استفاده شده در تحقیق حاضر، کنترل بیشتر کل فرایند رسوب دهی میسر می‌شود (۲۰). Akshat Mullerpatan و همکارانش با متصل کردن پپتید به ELP روشی را معرفی کرده‌اند که می‌تواند به شکلی انتخابی پروتئین هدف را به واسطه پپتید متصل به ELP شناسایی کند و سپس به دلیل رسوب پذیری انتخابی ELP پروتئین هدف از پروتئین‌های غیراختصاصی جداسازی می‌شود. در این روش بدون نیاز به پروتئاز و با تغییر غلظت یون‌های محلول پروتئین هدف از مجموعه ELP-peptide جداسازی شده و امکان استفاده مجدد از اجزای تخلیص وجود دارد که باعث کاهش چشمگیر هزینه تمام شده روش تخلیص می‌شود. میزان درصد خلوص به دست آمده در این روش تا بیش از ۹۷٪ گزارش شده است که بسیار بیشتر از روش ELP به تنهایی و یا استفاده از رزین Ni-NTA است (۲۱).



شکل ۶. نتایج وسترن بلات محصول نهایی تخلیص ELP-SK-His توسط ستون Ni-NTA و ELP، (۱) محتوی پروتئینی باکتری *E. coli* BL21 Rosseta فاقد پلاسمید، (۲) محصول تخلیص ELP-SK-His توسط ستون Ni-NTA، (۳) محصول تخلیص ELP-SK-His توسط SK-His و Ni-NTA، (۴) محصول تخلیص ELP-SK-His توسط ELP و رسوب دهی His

بحث

در این تحقیق، ابتدا ژن SK با موفقیت در پلاسمید pET21a-ELP کلون شد (شکل ۲)، سپس دو روش تخلیص پروتئین برای تخلیص SK به صورت جداگانه و در ترکیب با هم مورد ارزیابی قرار گرفت که یکی برپایه ستون‌های تمایلی (Ni-NTA) و دیگری مستقل از ستون انجام شد (ELP-based). در هر دو روش مطالعه حاضر، پروتئین (95kDa) ELP-SK-His با میزان بازدهی بالا (Error! Reference source not found) و خلوص مناسب (شکل ۵) جداسازی شد. مقدار محصول نهایی به دست آمده با استفاده از روش Ni-NTA به دست آمد در حالیکه بیشترین خلوص با استفاده از ترکیب روش‌های Ni-NTA و ELP حاصل شد (شکل ۶). همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، با تکرار مراحل تخلیص با استفاده از تغییر دما، تغییر غلظت نمک و به دنبال آن رسوب دهی به تدریج از میزان باندهای پروتئین غیر اختصاصی کاسته شده و میزان خلوص پروتئین ELP-SK-His بیشتر می‌شود. هرچند این فرآیند می‌تواند تا حدودی زمان‌بر باشد، اما نسبت به کروماتوگرافی تمایلی بسیار ارزان‌تر بوده و به تجهیزات و مواد کمتری نیاز دارد (۱۶). علاوه بر تکرار مراحل تخلیص به منظور دستیابی به میزان خلوص بالاتر پروتئین هدف، می‌توان از ELP در ترکیب با سایر

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در سازه ژنی ELP-SK-His بین ELP و SK جایگاه برش آنزیم پروتئاز Factor Xaa قرار داده شده است که می‌تواند در مراحل بعدی به منظور جداسازی ELP از SK مورد استفاده قرار گیرد. هرچند استفاده از پروتئاز منجر به افزایش مراحل تخلیص، تحمیل هزینه‌های اضافی و ایجاد تغییر در محصول نهایی می‌شود (۲۴) که جهت حل این مسئله اخیراً پلی‌پپتیدهای اینتئین با خاصیت خود برشی به عنوان جایگزین مناسبی برای پروتئازها معرفی شده‌اند. اینتئین‌ها با اتصال دو بازوی انتهایی C و انتهای N و اتصال قطعات پلی‌پپتیدی از ساختار پروتئینی اصلی خارج می‌شوند (۴، ۲۷-۲۴). پیشنهاد می‌شود که از تکنیک‌های جداسازی برچسب‌های تمایلی بدون نیاز به پروتئازها به مانند روش‌های مبتنی بر اینتئین استفاده کرد. مقایسه دو روش Ni-NTA و ELP در تخلیص پروتئین SK در این تحقیق نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین تخلیص شده با استفاده از روش Ni-NTA به دست می‌آید، در حالی که خلوص پروتئین تخلیص شده به واسطه ELP و Ni-NTA از هر کدام از این روش‌ها به تنهایی، بیشتر است. این نشان می‌دهد که ترکیب روش‌های ELP و Ni-NTA با یکدیگر در دست‌یابی به پروتئین‌های با خلوص بالاتر موثرتر از استفاده این روش‌ها به تنهایی است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از انستیتو پاستور ایران جهت حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Roque ACA, Lowe CR, Taipa MA. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* 2004; 20639-54.
2. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, et al. Protein production and purification. *Nat Methods* 2008; 5:135.
3. Nfor BK, Ahamed T, van Dedem GW, van der Wielen LA, van de Sandt EJ, Eppink MH, et al. Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. *J Chem Technol Biotechnol* 2008; 83:124-32.
4. Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 2006; 48:1-13.
5. Shi C, Han T-C, Wood DW. Purification of microbially expressed recombinant proteins via a dual ELP split intein system. *Methods Mol Biol* 2017; 1495:13-25.
6. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol* 2009; 463:439-73.
7. Cheung RCF, Wong JH, Ng TB. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 96:1411-20.

نتایج وسترن بلات نشان داد که باندهای پروتئینی غیراختصاصی بیشتری در محصول نهایی تخلیص شده توسط Ni-NTA در مقایسه با روش ELP وجود دارد (شکل ۶). علاوه بر این، نتایج SDS-PAGE تخلیص به واسطه Ni-NTA نیز تایید کننده خلوص بیشتر است (شکل ۵) که دلیل آن می‌تواند این باشد که در روش تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA پروتئین‌های درون سلولی میزبان نیز می‌توانند به دلیل توالی‌های حاوی اسید آمینه هیستیدین ذاتی به ستون Ni-NTA متصل شوند (۲۲). از این رو به نظر می‌رسد که تخلیص پروتئین به واسطه ELP در مقایسه با روش به ستون Ni-NTA دارای خلوص بیشتری باشد، هرچند که مقدار پروتئین تخلیص شده توسط این روش از روش Ni-NTA کمتر است. (**Error! Reference source not found.**) دکتر Akhani و همکارانش نیز به مقایسه تخلیص به واسطه ELP و His-Tag پرداختند که نتایج آنها میزان خلوص پروتئین آلفا-امیلاز تخلیص شده بیشتری در مقایسه با روش Ni-NTA را نشان داد، هرچند آنها مقدار پروتئین تخلیص شده بیشتری توسط ELP در مقایسه با Ni-NTA تخلیص کردند. نتایج وسترن بلات همچنین نشان داد که با ترکیب روش تخلیص ELP با Ni-NTA می‌توان از تخلیص همزمان پروتئین‌های غیراختصاصی که در فرایند تخلیص با ستون Ni-NTA همراه با پروتئین His-Tag دار جداسازی می‌شود جلوگیری کرد (شکل ۶). در تحقیقی که Trabbic□Carlson و همکارانش انجام دادند، چندین پروتئین با استفاده از ELP و Ni-NTA تخلیص و کارایی هر دو روش در تخلیص پروتئین را مشابه گزارش کردند. هر چند در مطالعه مذکور ترکیب دو روش ELP و Ni-NTA مورد ارزیابی قرار نگرفته است (۲۳).

8. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 2005; 4:98-105.
9. Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97:829-35
10. MacEwan SR, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides: Biomedical applications of tunable biopolymers. *J Pept Sci* 2010; 94:60-77.
11. Bellingham CM, Lillie MA, Gosline JM, Wright GM, Starcher BC, Bailey AJ, et al. Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties. *Biopolymers* 2003; 70:445-55.
12. Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags *Nat Methods* 2005; 2:659.
13. Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends biotechnol* 2010; 28:37-45.
14. Keramati M, Arabi RM, Memarnejadian A, Mirzaie A, Sazvari S, Aslani MM, et al. Towards a superior streptokinase for fibrinolytic therapy of vascular thrombosis. *Hematol Agents Med Chem* 2013; 11:218-29.
15. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Kruger NJ, Editor. *The protein protocols handbook*. New Jersey, United States: Humana Press; 2009. P.17-24.
16. Akhiani RC, Patel AT, Patel MJ, Dedania SR, Patel JS, Patel DH. Column Chromatography Free Purification of Recombinant α -Amylase from *Bacillus licheniformis* by Tagging with Hydrophobic Elastin Like Polypeptide. *Proc Natl Acad Sci India B* 2018; 88:1249-55.
17. Fong BA, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. *Microb Cell Fact* 2010; 9:77.
18. Fong BA, Wu W-Y, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expr Purif* 2009; 66:198-202.
19. Kim H, Chen W. A non-chromatographic protein purification strategy using Src 3 homology domains as generalized capture domains *J Biotechnol* 2016; 234:27-34.
20. Mills CE, Ding E, Olsen B. Protein Purification by Ethanol-Induced Phase Transitions of the Elastin-like Polypeptide (ELP). *Ind Eng Chem Res* 2019; 58:11698-709.
21. Mullerpatan A, Chandra D, Kane E, Karande P, Cramer S. Purification of Proteins using Peptide-ELP Based Affinity Precipitation. *J Biotechnol* 2020; 309:59-67.
22. Bolanos-Garcia VM, Davies OR. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:1304-13.
23. Trabbic-Carlson K, Liu L, Kim B, Chilkoti A. Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. *Protein Sci* 2004; 13:3274-84.
24. Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011; 80:283-93.
25. Volkmann G, Mootz HD. Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:1185-206.
26. Wang B, Luo L, Wang D, Ding R, Hong J. Efficient purification of a recombinant tag-free thermostable *Kluyveromyces marxianus* uricase by pH-induced self-cleavage of intein and expression in *Escherichia coli*. *3 Biotech* 2018; 8:400.
27. Wu H, Hu Z, Liu X-Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9226.