Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 30, No. 4, winter 2020 ORIGINAL ARTICLE

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

Masoud Seyedinkhorasani[1], Malihe Keramati[2], Reza Ahangari Cohan[3], Farzin Roohvand[4], Dariush Norouzian[5]

[1] PhD Student of Pharmaceutical Biotecnology, 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]

[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

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 µg/ml in ELP precipitation, 108 ± 14 µg/ml in Ni-NTA purification and 88 ± 11 µg/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

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۰، شماره ۴، زمستان ۹۹، صفحات ۳۸۷ تا ۳۹۵

Original Article

بررسی و مقایسه روش‌های مبتنی بر رسوب دهی و کروماتوگرافی تمایلی در تخلیص پروتئین نوترکیب 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] استاد، 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 پروتئین های نوترکیب 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 پروتئین های 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 خالص سازی در هریک از روش های تخلیص با میکروبرادفورد محاسبه شد.*

یافته‌ها: *بازده خالص سازی ELP-SK-His با استفاده از ستون Ni-NTA به مقدار ۱۴ ±۱۰۸ µg/ml و ELP به مقدار ۱۶ ±۷۶ µg/ml و ELP/Ni-NTA به مقدار ۱۱ ±۸۸ µg/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 نوترکیب 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 گونه ای 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، انستیتوپاستور 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

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 غلظت های 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 عموما روش‌هایی زمان‌بر و پرهزینه‌اند که نیاز به مراحل آماده سازی متعدد نمونه قبل از فرآیند تخلیص دارند (۶, ۷). با این وجود کروماتوگرافی تمایلی به دلیل اختصاصیت در بسیاری از پروتکل‌های خالص سازی 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 کارامدی موثرتر روش ساده و قابل دسترسی مانند His-tag/Ni-NTA ضروری به نظر می‌رسد (۸).

پلی پپتیدهای 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 مارپیچ های محلول در آب به رسوب های نامحلول تغییر وضعیت می‌دهد (۵, ۹). از همین ویژگی تشکیل رسوب برگشت‌پذیر 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 می کنند. در این ساختار n تعداد تکرار های 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 انعطاف‌پذیر باشد و پرولین مانع از تشکیل پیوند هیدروژنی پایدار در ساختارELP 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 (Tt)، 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 آب گریزی 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-Gly)$_{150}$ 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* ATTC 9542 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر شد و پس از برش با آنزیم‌های *XhoI* و *EcoRI* درون پلاسمید pET21a-ELP (اهدایی دکتر David Wood، 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 FactorXa قرار گرفت. پلاسمید pET21a-ELP-SK-His با PCR و هضم

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

آنزیمی توسط آنزیم های *Nde*I و *Xho*I تایید شد (شکل ۲). سپس با استفاده از شوک حرارتی در باکتری *E.coli* BL21 Rosseta (DE3) (Invitrogen™) 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 ۵ میلی لیتر و سپس به ۵۰۰ میلی لیتر محیط مایع 2XYT حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ۵۰ µg/mL انتقال داده شد و پس از انکوباسیون و رسیدن به دانسیته نوری ۰/۶ بیان پروتئین توسط IPTG با غلظت نهایی ۰/۸ mM القاء شد. باکتری‌های القاء شده به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور(۱۲۰ دور در دقیقه) نگهداری شدند. سپس با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه باکتری های القاء شده رسوب گیری شدند.

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

توده باکتریایی رسوب داده شده در بافر PBS (phosphate buffered saline) حل و سپس شکست سلولی با سونیکاسیون به مدت ۱۵ دقیقه (Amplitude 60, 15 sec on, 30sec off) روی یخ انجام شد. سپس محلول لیز سلولی به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل جداسازی و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۰ درجه همزده شد. سپس محلول نمک NaCl با غلظت ۵M تا زمان نمایان شدن رسوبات ابری شکل نامحلول به صورت قطره‌ای به آن اضافه شد. رسوبات نامحلول به دست آمده با سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) جداسازی و در دمای ۴ 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 ۲۰Imidazole 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 ۱۰µL از نمونه‌های تخلیص شده با بافر لودینگ حاوی 2-mercaptoethanol مخلوط و پس از جوشاندن و در ژل SDS-PAGE ۱۰ ٪ بارگذاری شد و در ادامه رنگ آمیزی کماسی بلو (G250)انجام شد. تعیین هویت پروتئین های 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 (bovine serum albumin) BSA به عنوان استاندارد با غلظت‌های (۰/۵-۶۰µg/ml) انجام شد (۱۵).

یافته‌ها

نتایج تایید ژن SK کلون شده در pET21a-ELP با هضم آنزیمی و PCR

همان طور که در شکل ۲ 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 پرایمر های اختصاصی جدول ۱ را نشان می دهد. مطابق آنچه در شکل ۲ نشان داده شده است اندازه قطعات برش خورده شده حاصل از هضم آنزیمی pET21a-ELP-SK-His با آنزیم های *Xho*I و *Nde*I کلونینگ ژن SK را تایید کرد.

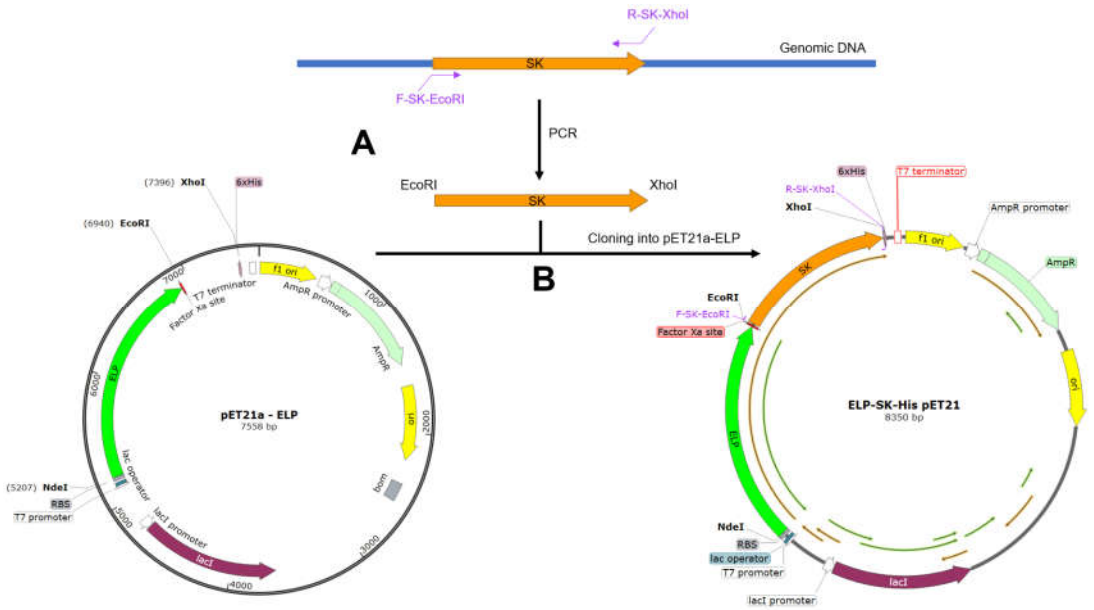
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

جدول ۱. توالی پرایمر های تکثیر SK

نام پرایمر	توالی پرایمر
R-SK-*Xho*I	ATATCTCGAGTTTGTCGTTAGGGTTATCAG
F-SK-*Eco*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 ELP-SK-His با استفاده از تغییر غلظت نمک وتغییر 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.

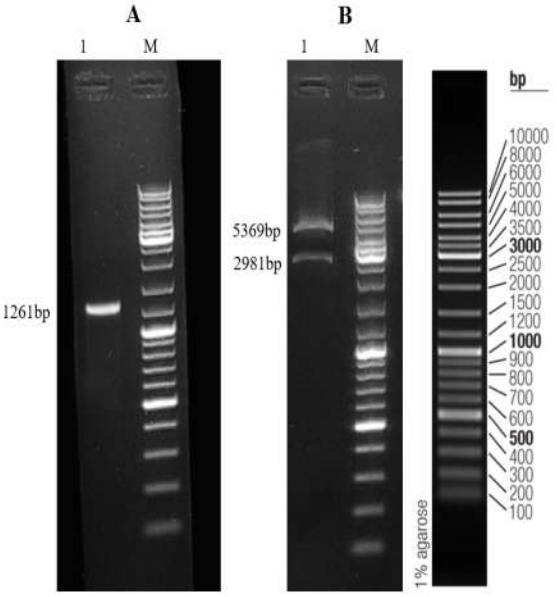
نتایج تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA و Ni-NTA/ELP:

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 Ni-NTA/ ELP (در ترکیب با یکدیگر نمایش) در شکل ۵ داده شده است. باند پروتئینی معادل 95 kDa~ بیانگر پروتئین ELP-SK-His خالص سازی شده است.

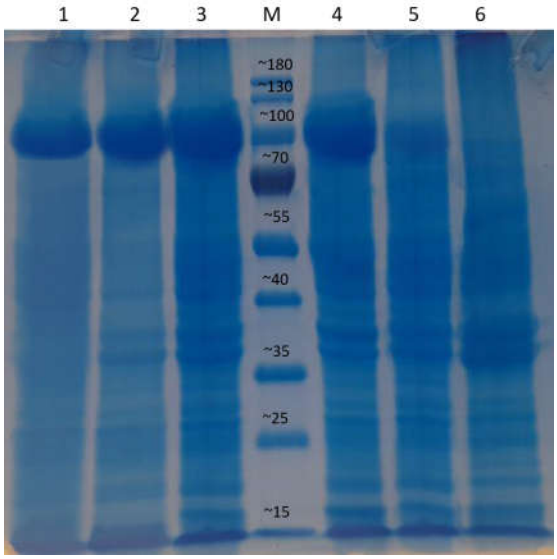
باند پروتئینی 95kDa~ توسط وسترن بلات نشان داده شد که بیانگر صحت پروتئین ELP-SK-His تخلیص شده با هر دو روش Ni-NTA و ELP است. مقدار پروتئین تخلیص شده با استفاده از هر دو روش Ni-NTA و ELP با استفاده

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

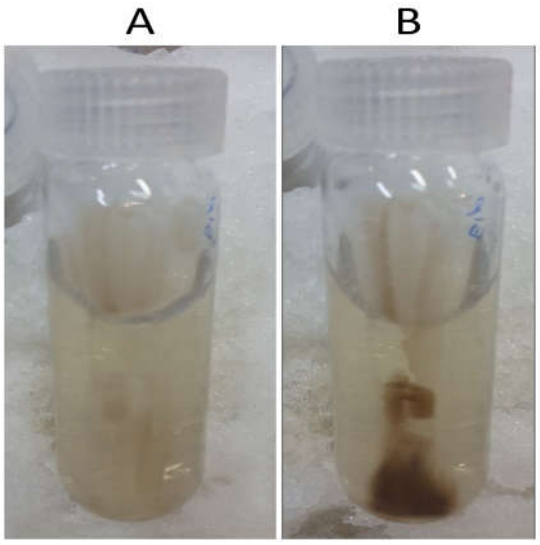
از میکرو برادفورد سنجیده شد و نتایج آن در **Error! Reference source not found.** نشان داده شده است.



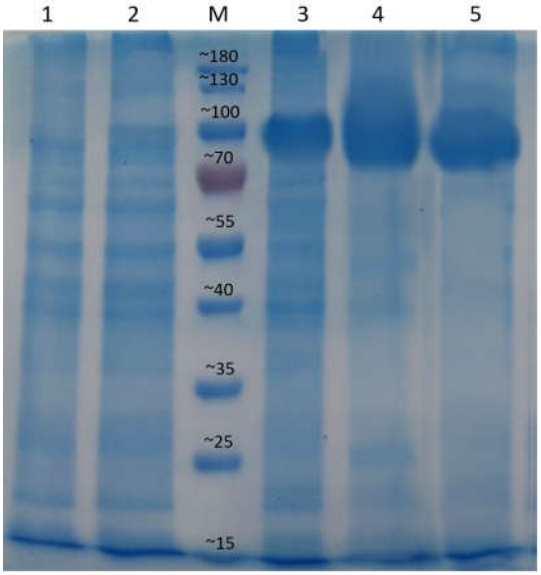
شکل ۲. نتایج تایید کلونینگ ژن SK با PCR و هضم آنزیمی (A) ژل آگارز مربوط به PCR پلاسمید pET21a-ELP-SK-His با پرایمرهای اختصاصی جدول۱ (B) نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pET21a-ELP-SK-Hisبا آنزیم های *Nde*I و *Xho*I



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

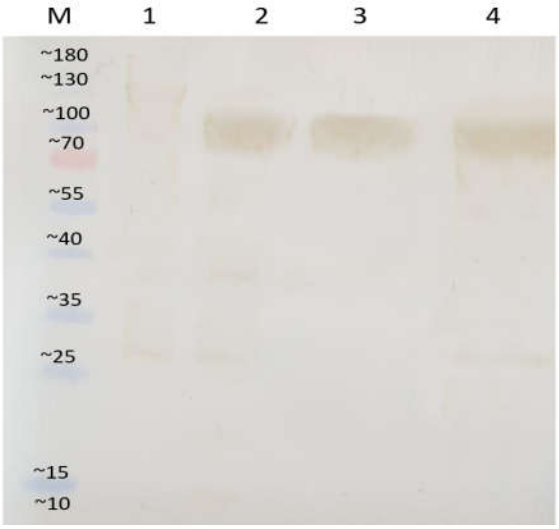


شکل ۴. تخلیص ELP-SK-His با استفاده از دما ۳۰ درجه و نمک NaCl (A) فاز محلول ELP-SK-His در دمای ۴ درجه و غلظت کم نمک (B) فاز نامحلول ELP-SK-His (رسوب تیره رنگ) در دمای ۳۰ درجه و غلظت بالای نمک NaCl.



شکل ۵. تخلیص پروتئین ELP-SK-His با استفاده از ستون Ni-NTA و ترکیبی Ni-NTA/ELP (۱) محتوی پروتئین باکتری E.coli BL21 Rosseta 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]



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 Ni-NTA و ELP، (۴) محصول تخلیص ELP-SK-His توسط ELP و رسوب دهی

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 ستون های تمایلی (Ni-NTA) و دیگری مستقل از ستون انجام شد (ELP-based). در هردو روش مطالعه حاضر، پروتئین ELP-SK-His (~95kDa) 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 روش های Ni-NTA و ELP حاصل شد (شکل ۶).

همان طور 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 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).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

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-آمیلاز 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 جلو گیری 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).

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 هزینه های اضافی و ایجاد تغییر در محصول نهایی می‌شود (۲۴) که جهت حل این مسئله اخیرا پلی‌پپتیدهای اینتئین با خاصیت خود برشی به عنوان جایگزین مناسبی برای پروتئازها معرفی شده‌اند. اینتئین‌ها با اتصال دو بازوی انتهای C و انتهای N و اتصال قطعات پلی پپتیدی از ساختار پروتئینی اصلی خارج می‌شوند (۴, ۲۷-۲۴). پیشنهاد می‌شود که از تکنیک‌های جداسازی برچسب‌های تمایلی بدون نیاز به پروتئازها به مانند روش های 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 انستیتوپاستور 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]
[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]

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 tagsNat 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. Akhani 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.5.2]

[DOI: 10.29252/iau.30.4.387]