Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.5, Aug 2017
Pages:361-370

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۶
صفحه: ۳۷۰-۳۶۱

همسانه سازی، بیان و ارزیابی عملکرد پروتئین شبه الاستین: پروتئین نوین در مهندسی پزشکی

ندا رضایی نسب[۱]، مهدی زین الدینی*[۲]، علی رضا سعیدی‌نیا[۳]

چکیده

مقدمه: پروتئین شبه الاستین یا ELP یک پلیمر زیستی مصنوعی شامل توالی‌های تکراری از پنتا پپتید VPGXG (X می‌تواند هر اسیدآمینه به غیر از پرولین باشد) است. این پروتئین یک پلی پپتید واکنشگر دمایی است که دارای یک فاز انتقالی برگشت‌پذیر است. در دمای زیر دمای انتقالی (Tt)، مولکول ELP به شکل فضایی باز شده درآمده و بنابراین در محلول‌های آبی به‌صورت محلول در می‌آید؛ اما وقتی دما به بالاتر از Tt تغییر و افزایش می‌یابد، ELP به‌صورت غیر محلول و شبه آگریگه از محلول خارج می‌شود. هدف مطالعه اخیر، همسانه سازی، بیان و ارزیابی فعالیت ELP_{60} بر مبنای Tt است.

روش بررسی: ابتدا ELP_{10} (۱۵۰ بازی) سنتز و درون پلاسمید pBluescript همسانه سازی شد. سپسELP_{60} (۹۰۰ بازی) با استفاده از روش الحاق تکراری هدایت شونده (RDL) تولید شد. در نهایت ELP_{60} درون پلاسمید pET25 تغییر یافته زیر همسانه سازی شد و بیان ELP_{60} با استفاده از روش SDS-PAGE تایید گردید. همچنین پروتئین ELP_{60} بر مبنای Tt و انجام چرخه انتقالی معکوس (ITC) که بیانگر فعالیت ELP_{60} است، تخلیص گردید.

نتایج: نتایج نشان داد سازه بیانی pET-ELP_{60} تولید شد و بیان و تخلیص موفقیت‌آمیز ELP_{60} (در حدود ۹۰٪) در یک مرحله و بدون نیاز به ستون کروماتوگرافی صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: از پروتئین نوترکیب تولیدی می‌توان در زمینه خالص‌سازی ساده و سریع پروتئین‌های دارویی نوترکیب، دارورسانی هوشمند و مهندسی بافت استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، پلی پپتید شبه الاستین، چرخه انتقالی معکوس، تخلیص، الحاق تکراری هدایت شونده.

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
۲- دانشیار، گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
۳- استادیار، گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
*(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۹۱۲۲۱۴۸۱۱۰، پست الکترونیکی: zeinoddini52@mut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

پیشرفت روزافزون فناوری زیستی و فناوری نانو و کاربردهای وسیع آن‌ها در پزشکی و دارورسانی، سبب نیاز به مواد زیستی جدید با کارایی بالا شده است. امروزه تولید موادی که قابلیت خودتجمعی و پاسخ‌دهی به تغییر شرایط محیطی داشته باشند از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این میان نقش پروتئین‌ها، به دلیل تنوع بالا و سهولت تولید آن‌ها، از سایر موکول‌های زیستی پررنگ‌تر است. درنتیجه مهندسی ژنتیک امکان توسعه پلیمرهای زیستی جدید با پیچیدگی و عملکرد مشابه پلیمرهای طبیعی ساخته شده در طبیعت را فراهم نموده است. با استفاده از سنتز DNA این امکان وجود دارد که انواع دومین‌های عملکردی را در یک پروتئین بکار ببریم که هم ویژگی‌های اتصال به سلول را داشته باشد، هم ویژگی‌های مهاجرت و تمایز و نیز ویژگی‌های مکانیکی لازم را به منظور استفاده و کاربرد مورد نظر، داشته باشد. از این منظر، یکی از پلیمرهای زیستی مصنوعی که دارای کاربردهای پزشکی و فناوری زیستی زیادی است، پلی‌پپتید شبه‌الاستین (ELP, Elastin like protein) است. ELP یک پلیمر زیستی مصنوعی مهندسی و مشتق شده از توالی اسیدآمینه‌ای موجود در بخش‌های آب‌گریز تروپوالاستین است که به‌صورت یک پلیمر هوشمند، قابلیت خود تجمعی را داراست (۱،۲). ترادف اسیدآمینه‌ایELP ، اغلب شامل توالی تکراری (پالیندروم) است که از ۵ آمینواسید VPGXG تشکیل می‌شود. X می‌تواند هر اسیدآمینه به‌جز پرولین باشد. داخل شدن پرولین سبب می‌شود که ارتباطات آب‌گریز برای اتصال پلی‌پپتید شبه الاستین تغییر یابد (۵-۳). از سوی دیگر، ELP یک پلی پپتید واکنشگر گرمایی است که دارای خاصیت خودتجمعی وابسته به دما است. برای این پروتئین سنتزی، یک دمای واکنشی بنام دمای انتقالی معکوس (RTC or ITC, Reversible or Inverse Transition Temprature) یا کمترین دمای بحرانی محلول (LCST, Lower Critical Solution Temprature) تعریف می‌گردد. ویژگی پروتئین ELP طوری است که اگر دمای محلول واکنش، کمتر از دمای انتقالی (Tt)، باشد، موکول‌های ELP کانفورماسیون گسترده ایجاد کرده و بنابراین در محلول واکنش، به‌صورت محلول قرار می‌گیرد؛ اما وقتی دمای محیط واکنش را به دمای بالاتر از Tt تغییر می‌دهیم، مولکول‌های ELP به‌صورت خیلی سفت و محکم درآمده و از محلول آبی به‌صورت قطعات غیر محلول و آگریگه شده، خارج می‌شود (۸-۶). جهت سنتز ELP، با توجه به ساختارهای تکراری و الیگومریزاسیون در آن، از روشی ابداعی به نام الحاق تکراری هدایت شونده (RDL, Recursive Directional Ligation) استفاده می‌شود. به منظور انجام تکثیر با این روش، ابتدا توالی ۵-۱۰ تایی از پلی‌پپتید شبه الاستین در یک الیگومر کوتاه سنتز می‌شود و سپس در هر بار انجام RDL، این قطعه به وکتور خطی شده متصل می‌گردد و از آن یک کتابخانه ژنی با توالی‌های متفاوت تهیه می‌گردد (۹،۱۰).

ELP از حدود ۴۵ سال پیش تاکنون موضوع بسیاری از مطالعات بوده است و در ۲۰ سال اخیر کار بر روی این ماکروملکول‌ها بسیار گسترش یافته است. این پلی‌پپتید در میزبان‌های مختلفی ازجمله باکتری، گیاه و قارچ بیان شده است که بیشترین مطالعات بر روی بیان آن در *E.coli* انجام گرفته است (۱۳-۱۱). همان‌گونه که اشاره شد، ELP دارای کاربردهای گسترده و وسیعی در حوزه‌های فناوری زیستی و پزشکی است. کاهش هزینه‌های تخلیص، افزایش میزان و مدت رسانش دارو به سلول‌ها به خصوص سلول‌های سرطانی، تولید هیدروژل‌های مطلوب برای مهندسی بافت، تولید میسل‌های مناسب حامل دارو در فناوری نانو از جمله مزیت‌های مهم این پلیمر زیستی است (۱۴). از طرف دیگر، امکان تولید راحت این پلیمر در باکتری و در حجم بالا و نیز امکان کنترل دقیق توالی و رفتار بیوپلیمر بر اهمیت پرداختن به آن می‌افزاید. در نتیجه علت کاربرد وسیع این پروتئین مصنوعی را می‌توان به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن دانست که به‌صورت زیر خلاصه بندی می‌شود. (۱) Tt مربوط به ELP دارای دامنه وسیعی (۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) است. درنتیجه بر اساس این خصوصیت می‌توان نمونه‌های مختلف ELP برای کاربردهای اختصاصی (نظیر رهایش دارو، تولید داروی نوترکیب یا داروهای کاشتنی)،

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

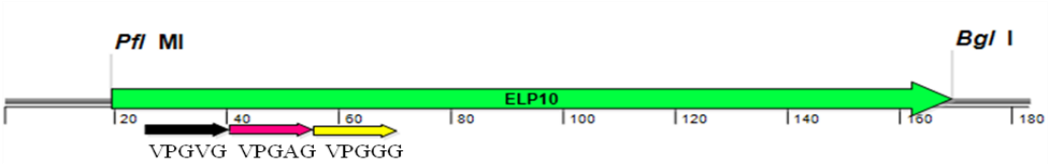
طراحی نمود (۹،۱۵). (۲) ELP می‌تواند از یک منومر اولیه به شکل نوترکیب درون باکتری *E.coli*، به‌صورت پلیمرهایی با اندازه‌های متفاوت تولید گردد. درنتیجه در رهایش کنترل‌شده دارو، حذف آن از بدن و نیمه عمر پلیمر در داخل بدن که وابسته به طول پلیمر است، تأثیرگذار است (۱۶،۱۷). (۳) ELP می‌تواند در میزان گرم در لیتر تولید شود که از نظر هزینه‌ای مقرون به‌صرفه است (۱۸). (۴) ELP یک پلیمر سازگار زیستی است، لذا در مطالعات درون بدن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۹). (۵) ELP می‌تواند برمبنای نوع اسیدآمینه قرار داده شده در موقعیت X، علاوه بر دما، نسبت به سایر محرک‌های فیزیکی (نظیر عوامل احیایی، pH و نور) نیز واکنش خودتجمعی از خود نشان دهد (۲۲-۲۰).

هدف تحقیق حاضر تولید مصنوعی و نوترکیب پلیمر زیستی ELP_{60} به میزان ۹۰۰ بازی و وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلودالتون، با استفاده از روش مولکولی RDL است. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد ELP به خصوص عملکرد خودتجمعی آن، انجام موفقیت‌آمیز تخلیص این پروتئین با استفاده از روش ITC، بیانگر صحت عملکرد نمونه پروتئین نوترکیب تولیدی است که می‌تواند در مطالعات بعدی برای استفاده‌های پزشکی مورد بهره برداری قرار گیرد.

روش بررسی

الیگومریزاسیون ELP:

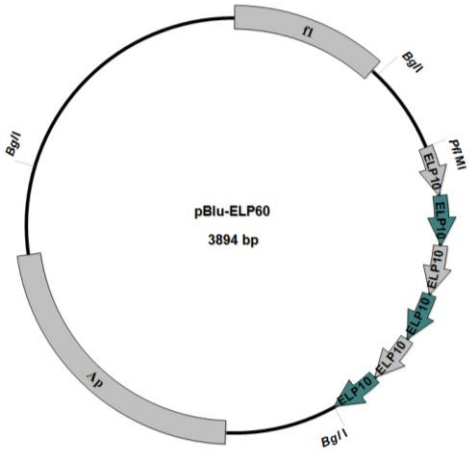
ابتدا منومر ELP_{10} با توالی $[VPGV(G/A)G]_{10}$ که به رمز درآورنده ۵۰ اسیدآمینه است توسط شرکت ژن فناوران سنتز شد و در جایگاه *EcoRV* پلاسیمدpBluescript همسانه سازی شد. به منظور الیگومریزاسیون و زیر همسانه سازی، جایگاه‌های آنزیمی *PflMI* و *BglI* به ترتیب در انتهای $5'$ و $3'$ ترادف ELP_{10} قرار داده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویری از ترادف اسیدآمینه‌ای و نقشه ژنی ELP_{10}

سپس با استفاده از روش RDL کتابخانه‌ای از ۵ پلیمر ELP به دست آمد. برای این منظور ابتدا پلاسمید نوترکیب حاوی ELP_{10} که pBlue-ELP_{10} نام‌گذاری شده بود، با استفاده از دو آنزیمی *PflMI* و *BglI* هضم شد تا قطعه ELP_{10} آزاد گردد. به موازات پلاسمید pBlue-ELP_{10} با استفاده از آنزیم *PflMI*، خطی شده و انتهای $5'$ آن توسط آنزیم فسفاتاز (CIP, calf intestinal alkaline phosphatase)، دفسفوریله شد. در ادامه هر دو قطعه ژنی و پلاسمید خطی شده از روی ژل تخلیص و با استفاده از آنزیم T4 لیگاز، به همدیگر متصل و درون باکتری *E.coli* سویه XL1-Blue انتقال یافت. بر این اساس بعد از ۵ بار تکرار روش RDL، الیگومریزاسیون ELP_{10} به ترتیب انجام و ELP_{20}، ELP_{30}، ELP_{40}، ELP_{50} و ELP_{60} به دست آمد (شکل ۲). الیگومریزاسیون صحیح با استفاده از هضم دو آنزیم پلاسمید pBlue-ELP (*PflMI* / *BglI*) و تعیین ترادف ELP_{60}، تایید گردید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۲: نقشه پلاسمیدی pBlue-ELP$_{60}$ و نحوه الیگومریزاسیون با استفاده از روش RDL

همسانه سازی و بیان ELP$_{60}$:

برای همسانه سازی و بیان ELP$_{60}$، از وکتور تغییر شکل یافته pET25b (Novagen, 69753-3) استفاده شد. در وکتور تغییر شکل یافته، جایگاه برش آنزیمی *SfiI* بین دو جایگاه آنزیمی *NdeI* و *EcoRI* اضافه شده است. این ترادف با ترادف پالیندرومی ELP (VPGV (G/A) G)، پس از اتصال قطعه ELP$_{60}$ درون پلاسمید pET25b ، سازگار است. جهت همسانه‌سازی، ابتدا قطعه ELP$_{60}$ از پلاسمیدpBlue-ELP$_{60}$ ، در اثر هضم دو آنزیمی *NdeI* و *EcoRI* جدا و تخلیص می‌شود. به موازات، پلاسمید pET25b تغییر یافته نیز با آنزیم *SfiI* خطی و تخلیص می‌گردد. پس از اتصال دو بخش، محصول به دست آمده درون باکتری *E.coli* سویه XL1-Blue انتقال یافت. پلاسمید جدید تولیدی (pET-ELP$_{60}$) با استفاده از هضم دو آنزیمی (*EcoRI* / *NdeI*) تایید گردید. در ادامه پلاسمید pET-ELP$_{60}$، به باکتری بیانی انتقال یافت و پس از کشت باکتری در محیط کشت حاوی۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رسیدن به OD_{600}=0.6، با استفاده از یک میلی‌مولار IPTG، القاء صورت گرفت. در نهایت بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص ELP$_{60}$:

تخلیصELP$_{60}$ با استفاده از سه بار تکرار گرما دهی و سرمادهی متوالی (روش ITC)، انجام شد. برای این منظور عصاره سلولی باکتری نوترکیب، بعد از ۱۰ چرخه سونیکاسیون در بافر نمکی فسفات (PBS) همراه با یک میلی‌مولار NaCl و سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه، به دست آمد. برای سیکل گرمادهی، عصاره حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ، رسوب سلولی که حاوی ELP است، پس از محلول سازی برای چرخه سرمادهی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این مراحل سه بار تکرار شد و از هر چرخه جهت آنالیز با SDS-PAGE، نمونه‌برداری شد.

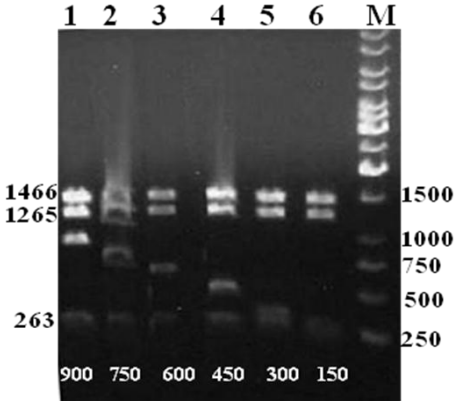
نتایج

سنتز مصنوعی **ELP$_{60}$** و سازه بیانی

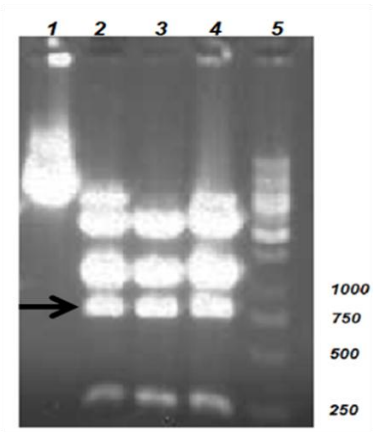
سنتز مصنوعی بر اساس روش ارائه داده شده از سوی چیکوتی (۸) و پس از ۵ بار تکرارRDL انجام گرفت. بر این اساس از منومر ELP$_{10}$ کتابخانه‌ای از ELP تا ELP$_{60}$ به دست آمد. کتابخانه تولیدی بروی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). مطابق شکل بعد از هر مرحله RDL، یک قطعه ۱۵۰ بازی به منومر اولیه اضافه می‌شود؛ که با استفاده از هضم دو آنزیمی (*BglI* / *PfimI*) قطعات ۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰ و ۹۰۰ بازی از پلاسمید مربوطه جدا می‌شود. در نهایت پلاسمید آخر (pBlue-ELP$_{60}$) برای زیرهمسانه‌سازی ELP$_{60}$ درون پلاسمید تغییر شکل یافته pET25، بکار برده می‌شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

جهت تولید پلاسمید نوترکیب pET-ELP$_{60}$، محصول هضم دو آنزیمی pBlue-ELP$_{60}$ که یک قطعه حدود ۹۰۰ بازی است درون پلاسمیدpET25 خطی شده توسط آنزیم *SfiI*، زیرهمسانه‌سازی می‌شود. هضم دو آنزیمی (*PflMI/BglI*) پلاسمید نوترکیب جدید و آزاد شدن قطعه ۹۰۰ بازی تاییدکننده حضور ELP$_{60}$ درون پلاسمید جدید تولیدی است (شکل ۴). همچنین قطعه مربوطه مورد تایید توالی نیز قرار گرفت که نتایج بیانگر صحت همسانه سازی قطعه مربوطه است (نتایج نشان داده نشده است).



شکل ۳: بررسی کتابخانه پلیمری ELP با استفاده از هضم دو آنزیمی *PflMI/BglI*. (۱) ELP$_{60}$، (۲) ELP$_{50}$، (۳) ELP$_{40}$، (۴) ELP$_{30}$ ، (۵) ELP$_{20}$، (۶) ELP$_{10}$، (M) مارکر وزنی DNA (1kb).

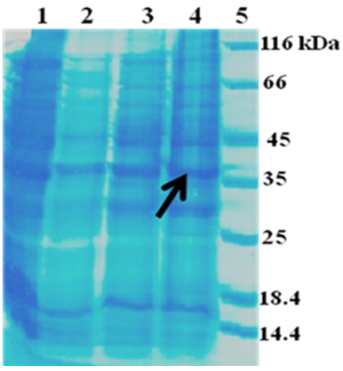


شکل ۴: هضم دو آنزیمی PflMI/BglI پلاسمید نوترکیب pET-ELP60. (۱) پلاسمید هضم نشده، (۲، ۳ و ۴) پلاسمید هضم شده، (۵) مارکر وزنی DNA (1kb).

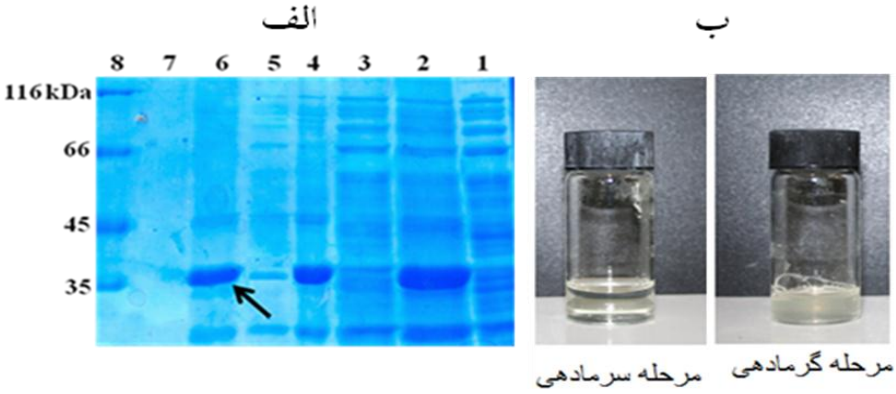
تولید ELP$_{60}$:

باکتری نوترکیب BL21 (DE3)، حاوی پلاسمید بیانی pET-ELP$_{60}$، پس از القاء با استفاده از روش SDS-PAGE موردبررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۵، بیان با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلودالتونی، تایید گردید. در ادامه بعد از سه بار تکرار ITC (چرخه متوالی گرمادهی و سرمادهی)، پروتئین ELP$_{60}$ در حدود ۹۰٪ خالص گردید. بعد از هر مرحله ITC، از محلول‌های به دست آمده نمونه‌گیری شد و با استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶- الف). آگریگاسیون ماکروسکوپی و قابل برگشت ELP$_{60}$ در اولین چرخه ITC قابل مشاهده است (شکل ۶- ب)؛ که این امر تایید کننده عملکرد مطلوب ELP$_{60}$ تولیدی است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۵: آنالیز عصاره پروتئینی باکتری نوترکیب در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری با استفاده از روش SDS-PAGE. باکتری بدون پلاسمید (۱)، باکتری نوترکیب در زمان‌های صفر (۲)، ۴ (۳) و ۱۶ ساعت بعد از القاء (۴). مارکر وزنی پروتئین (۵).



شکل ۶: الف- آنالیز خالص‌سازی ELP60 با استفاده از سه مرحله ITC. (۱) عصاره سلولی محلول، (۲) رسوب مجدد محلول شده مربوط به ITC اول، (۳) محلول رویی حاصل ITC اول، (۴) رسوب مجدد محلول شده مربوط به ITC دوم، (۵) محلول رویی حاصل ITC دوم، (۶) رسوب مجدد محلول شده مربوط به ITC سوم، (۷) محلول رویی حاصل ITC سوم، (۸) مارکر وزنی پروتئین. ب- تصویر میکروسکوپی آگریگاسیون قابل‌برگشت ELP60 با استفاده از ITC.

بحث و نتیجه گیری

پپتیدهای مشتق شده از الاستین دارای کاربردهای زیادی در فناوری زیستی و پزشکی است. از آن جمله می‌توان به رهایش کنترل‌شده دارو (۲۳،۲۴)، مهندسی بافت (۲۵) و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب (۲۶-۳۰) اشاره نمود. اولین بار این پروتئین در سال ۲۰۰۲ توسط چیلکوتی (Chilkoti) به‌صورت مصنوعی و از طریق مهندسی ژنتیک تولید شد (۹) و تا به امروز مورد استفاده فراوانی قرار گرفته است. در سال ۲۰۰۵، وود (Wood) و همکاران از این پروتئین در حالت هیبرید شده با اینتئین (Intein) جهت تخلیص پروتئین‌های نوترکیب استفاده نمود (۲۷). در تولید ELP، طول پلیمر و تعیین دمای انتقالی Tt، از اهمیت زیادی برخوردار است. به طوری که اگر طول توالی بیش‌ازحد کوتاه باشد تخلیص به‌خوبی صورت نمی‌گیرد و اگر توالی بیش‌ازحد بلند باشد نیز در فرآیند تخلیص ایجاد اشکال می‌کند. در بررسی‌های به عمل آمده از پژوهش‌های فانگ (Fong) و همکاران در سال ۲۰۱۰ که بر روی پلی پپتید شبه الاستین برای تخلیص پروتئین صورت گرفته است، نشان می‌دهد که چنانچه طول توالی کوتاه باشد تخلیص بهتر صورت می‌گیرد (۳۱). به همین منظور در این پروژه از طول ۹۰۰ جفت بازی و ۶ تکرار ۱۰تایی از توالی VPGV(G/A)G استفاده شد تا بهترین حالت برای تخلیص پروتئین، جهت مطالعات آتی، ایجاد گردد. همچنین یکی از عوامل مؤثر بر روی دمای Tt نوع اسیدآمینه موقعیت X است. والین، گلیسین و آلانین، جزو اسیدهای آمینه آب‌گریز و غیرقطبی هستند که در این پژوهش در موقعیت X به‌صورت متوالی استفاده شده است. درصورتی‌که اگر از اسیدهای آمینه کاتیونی یا آنیونی استفاده می‌شد، بر روی دمای Tt اثر

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

می‌گذارد. به طوری که اگر این موقعیت آب‌دوست باشد دمای Tt افزایش می‌یابد و اگر آب‌گریز باشد، این دما کاهش می‌یابد. در بررسی‌های به عمل آمده دیده شده است که این نوع توالی‌ها تحت تأثیر غلظت نمک قرارگرفته و Tt به شدت کاهش یا افزایش می‌یابد به طوری که حتی تغییر دما از ۱۵-۴۲ درجه سانتی‌گراد (به‌ویژه درتوالی‌های کاتیونی) مشاهده شده است (۳،۴). درنتیجه در طراحی توالی شبه الاستین از اسیدهای آمینه والین، گلیسین و آلانین که آب‌گریز بوده استفاده شد تا اگر نیاز به استفاده از غلظت نمک شد، دما به شدت کاهش یا افزایش نیابد. در ضمن اندازه پروتئین تولیدی بیش از اندازه مورد انتظار بود (۹۰۰ بازی و ۳۵ کیلودالتون) که با نتایج ارائه‌شده توسط مک فرسون (McPherson) و همکاران در سال ۱۹۹۶ که اعلام شده بود به دلیل ساختار خاص ELP، اندازه پروتئین ۲۰٪ بیش‌تر از حد معمول مشاهده می‌شود، مطابقت دارد (۳۲). همچنین تحقیقات نشان داده که استفاده از ELP، استراتژی بهتری نسبت به سایر روش‌ها در خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب است. در مطالعه‌ای که توسط وود در سال ۲۰۰۹ انجام شد، میزان پروتئین به دست‌آمده در دو روش تخلیص با استفاده از دنباله الیگو هیستیدین و تخلیص با استفاده از دنباله ELP بر روی چهار پروتئین کلرامفنیکل استیل ترانسفراز، پروتئین‌های فلورسنت آبی، تیوردوکسین و کالمودولین، با هم مقایسه شدند. نتایج حاصله نشان‌دهنده برتری تخلیص پروتئین در شرایط استفاده از روش تخلیص با دنباله ELP نسبت به تخلیص با دنباله الیگو هیستدینی است (۳۳).

در نتیجه با توجه به کارایی‌های منحصربه‌فرد ELP در فناوری زیستی و پزشکی، متأسفانه در داخل کشور فعالیت‌های بسیار محدودی انجام شده است. در تحقیق حاضر تولید نوترکیب ELP_{60} در دستور کار قرار گرفت که این پروتئین با موفقیت تولید شده و قابلیت توسعه و تولید نمونه‌های بزرگ‌تر آن نیز فراهم است و می‌تواند برای مطالعات بعدی در حوزه‌های پزشکی و فناوری زیستی، مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

پروژه فوق در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر در قالب پایان‌نامه دانشجویی با عنوان " کلون و بیان پلی پتید شبه الاستینی(ELP)"، انجام گرفته است و بودجه آزمایش‌های فوق از سوی این دانشگاه تامین شده است. بنابراین جا دارد تا از زحمات مسئولین این دانشگاه، سپاسگزاری گردد.

References:

1- Kowalczyk T, Hnatuszko-Konka K, Gerszberg A, Kononowics AK. ***Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers.*** World J Microbiol Biotechnol 2014; 30(8): 2141-52.

2- Roberts S, Dzuricky M, Chilkoti A. ***Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins.*** FEBS Lett 2015; 589(19): 2477-86.

3- Li B, Alonso DO, Daggett V. ***The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin.*** J Mol Biol 2001; 305(3): 581-92.

4- Park JE, Won JI. ***Thermal behaviors of Elastin- like Polypeptides (ELPs) according to their physical properties and environmental conditions.*** Biotechnol Biopro Eng 2009; 14: 662-67.

5- Ribeiro A, Arias FJ, Reguera J, Alonso M, Rodriguze-Cabello JC. ***Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers.*** Biophys J 2009; 97(1): 312-20.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

6- Gao W, Xu D, Lim DW, Craig SL, Chilkoti A. ***In situ growth of a thermoresponsive polymer from a genetically engineered elastin-like polypeptide.*** Poltm Chem 2011; 2: 1561-66.

7- Christensen T, Amiram M, Dagher S, Trabbic-Carlson K, Shamji MF, Setton LA, et al. ***Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins***. Protein Sci 2009; 18(7): 1377-87.

8- Meyer DE, Chilkoti A. ***Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides.*** Biomacromulecules 2004; 5(3): 846-51.

9- Meyer DE, Chilkoti A. ***Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation : examples from the elastin-like polypeptide system***. Biomacromol 2002; 3(2): 357-67.

10- McDaniel JR, MacKay JA, Quiroze FG, Chilkoti A. ***Recursive Directional Ligation by Plasmid Reconstruction allows Rapid and Seamless Cloning of Oligomeric Genes*** . Biomacromol 2010; 11(4): 944-52.

11- Sallach RE, Conticello VP, Chaikof EL. ***Expression of a recombinant elastin-like protein in pichia pastoris.*** Biotechnol Prog. 2009; 25(6):1810-18.

12- Conley AJ, Joensuu JJ, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE. ***Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants.*** Biotechnol Bioeng 2009; 103(3):562-73.

13- 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(12):3274-84.

14- Arias FJ, Santos M, Fernandez-Colino A, Pinedo G, Girotti A. ***Recent contributions of elastin-like recombinamers to biomedicine and nanotechnology.*** Curr Top Med Chem 2014; 14(6):819-36.

15- Simnick AJ. ***Biomedical and biotechnological applications of elastin like polypeptides.*** Polymer Rev 2007; 47(1): 121-54.

16- Ghandehari H, Cappello J. ***Genetic engineering of protein-based polymers: Potential in controlled drug delivery - Commentary.*** Pharm Res 1998; 15:813–815.

17- Coolbaugh MJ, Shakalli Tang MJ, Wood DW. ***High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags.*** Anal Biochem 2017; 516: 65-74.

18- Chow DC, Dreher MR, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A. ***Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in E-coli.*** Biotechnol Prog 2006; 22:638–646.

19- Urry DW, Parker TM, Reid MC, Gowda DC. ***Biocompatibility of the bioelastic materials, poly(Gvgvp) and its gamma-irradiation cross-linked matrix*** - summary of generic biological test results 1991; 6(3): 263-82.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

20- Urry DW, Peng S, Parker T. ***Delineation of electrostatic- and hydrophobic-induced pka shifts in polypentapeptides: the glutamic acid residue.*** J Am Chem Soc 1993; 115:7509–7510.

21- Nagapudi K, Brinkman WT, Leisen JE, Huang L, McMillan RA, Apkarian RP, Conticello VP, Chaikof EL. ***Photomediated solid-state cross-linking of an elastin-mimetic recombinant protein polymer.*** Macromolecules 2002; 35:1730–1737.

22- Urry DW, Hayes LC, Gowda DC, Harris CM, Harris RD. ***Reduction-driven polypeptide folding by the delta-TT mechanism.*** Biochem Biophys Res Commun. 1992; 188:611–617

23- Walkera L, Perkins E, Kratzb F, Raucher D. ***Cell penetrating peptides fused to a thermally targeted biopolymer drug carrier improve the delivery and antitumor efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative.*** Int J Pharm 2012; 436: 825-32.

24- MacEwan SR, Chilkoti A. ***Applications of elastin like polypeptides in drug delivery.*** J Con Rel 2014; 190: 314-30.

25- Nettles DL, Chilkot A, Setton LA. ***Applications of Elastin-like Polypeptides in Tissue Engineering.*** Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 1479-85.

26- Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. ***Elastin-like Polypeptides as a Purification Tag for Recombinant Proteins.*** Curr Protoc Protein Sci 2010; Chapter 6: Unit 6.11.

27- Banki MR, Feng LA, Wood DW. ***Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags.*** Nat Methods 2005; 2: 659-61.

28- Meyer DE, Chilkoti A. ***Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides.*** Nat Biotechnol 1999; 17(11): 1112–15.

29- Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. ***Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical applicatiom.*** Trends Biotechnol 2010; 28(1): 37-45.

30- 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.

31- Fong BA, Gillies AR, Ghazi I, LeRoy G, Lee KC, Westblade LF, et al. ***Purification of Escherichia coli RNA polymerase using a self-cleaving elastin-like polypeptide tag.*** Protein Sci 2010; 19(6): 1243-52.

32- McPherson DT, Xu J, Urry DW. ***Product purification by reversible phase transition following Escherchia coli expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastromeric pentapeptide GVGVP.*** Protein Expr Purif 1996; 7(1): 51-7.

33- Fong BA, WY W, Wood DW. ***Optimizing of ELP –intein mediated protein purification by salt substitution.*** Protein Expr Purif 2009; 66(2): 198-202.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

Cloning, expression and functional assessment of elastin like protein: a new protein in medical engineering

Neda Rezaeinasab [1], Mehdi Zeinoddini *[2], Ali Reza Saeeidinia [3]

[1,2,3] Genetic Engineering, Department of Bioscience and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Received: 29 Dec 2016 **Accepted:** 6 Jul 2017

Abstract

Introduction: Elastin like protein or ELP is a synthetic biopolymer consisting the pentapeptide repeats of VPGXG (X can be any amino acid except Pro). This protein is the thermal responsive polypeptide that undergoes a reversible phase transition. At a temperature below the transition temperature (Tt), ELP molecules assume an extended conformation and thus are soluble in aqueous solution; but upon the temperature shift higher than the Tt, however, ELPs become insoluble and form the segregated phase prone to 'aggrigate' form. The aim of this study was cloning, expression and activity of ELP_{60} according to Tt.

Methods: Firstly, ELP_{10} (150 bp) was synthesized and cloned into pBluescript. Then, Elp_{60} (900 bp) was produced using recursive directional ligation (RDL). Finally, ELP_{60} was subcloned into modified pET25 and ELP_{60} expression was confirmed using SDS-PAGE method. Also, ELP_{60} were purified according to Tt and performance of inverse transition cycle (ITC), which confirmed its activity.

Results: The results were shown that the pET-ELP_{60} constructed and ELP_{60} expressed; it was successfully purified (about 90%) in one step and non-chromatographic method.

Conclusion: From produced recombinant protein can be used for simple and easy purification of the recombinant protein as pharmaceutical drug, smart drug delivery and tissue engineering.

Keywords: Cloning, Elastin Liked Protein, Inverse Transition Cycling, Purification, Recursive Directional Ligation.

This paper should be cited as:

Rezaeinasab N, Zeinoddini M, Saeeidinia AR. **Cloning, expression and functional assessment of elastin like protein: a new protein in medical engineering.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(5): 361-70.

***Corresponding author: Tel: 09122148110, email: zeinoddini52@mut.ac.ir**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]