مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۵
صفحه: ۲۴۰-۲۳۲

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.3, Jun 2016
Pages:232-240

همسانه‌سازی و بیان ایمونوتوکسین اونتاک به صورت هیبریدی با دنباله اینتئینی

سیدعلی موسوی‌زاده[۱]، مهدی زین الدینی*[۲]، علیرضا سعیدی‌نیا[۳]، محمدعلی نصیری خلیلی[۴]

چکیده

مقدمه: اینتئین‌ها بخش‌های درونی در برخی پروتئین‌های مخمری و یوکاریوت‌های تک سلولی هستند که می‌توانند در فرآیند پیرایش پروتئین‌ها از مابقی پروتئین جدا شوند. بعد از شناسایی مکانیسم عملکرد اینتئین‌ها، کاربرد این توالی‌ها در تخلیص تک مرحله‌ای پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه قرار گرفته و دنباله‌های خود برشگر اینتئینی مختلفی گسترش یافتند. مزیت روش کاربرد دنباله‌های اینتئینی برای تخلیص پروتئین‌ها نسبت به بقیه روش‌های تخلیص پروتئین، عدم احتیاج به آنزیم‌های پروتئازی و مراحل حذف پروتئاز می‌باشد که این روش را از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌کند. در این مطالعه، ژن به رمز درآورنده Denileukin Diftitox (با نام تجاری اونتاک،Ontak) بصورت مولکولی با دنباله اینتئینی تلفیق گردید و میزان بیان آن در پلاسمید pTXB1 مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، بر اساس جایگاه‌های چندتایی همسانه‌سازی(MCS) وکتور pTXB1، پرایمرهای مناسب طراحی شدند و پس از تکثیر قطعه کدکننده اونتاک، همسانه‌سازی با استفاده از آنزیم‌های NdeI و SapI انجام گرفت. این سازه نوترکیب(PTX-IDZ) به سلول‌های E.coli سویه ER2566 ترانسفورم گردید و بیان اونتاک مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: همسانه‌سازی توالی اونتاک در تلفیق با دنباله اینتئینی در وکتور بیانی pTXB1 توسط PCR و برش آنزیمی تائید شد. بیان پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE آنالیزو با روش لکه گذاری وسترن تائید گردید.

نتیجه‌گیری: جایگاه آنزیم محدودکننده SapI در محل تلفیق توالی اونتاک با دنباله اینتئینی عدم ورود هیچ اسید آمینه اضافه‌ای را در پروتئین هدف، تضمین می‌نماید. همچنین بیان ایمونوتوکسین اونتاک در این سازه نسبت به بیان این پروتئین به صورت تلفیق شده با دنباله هیستیدینی ارزیابی گردید. با توجه به بیان مناسب پروتیئن اونتاک، در مراحل بعدی، تخلیص تک مرحله‌ای پروتئین دارویی اونتاک انجام خواهد گرفت.

واژه‌های کلیدی: اینتئین، ایمونوتوکسین‌ها، همسانه‌سازی، پروتئین‌های نوترکیب

۱- دانشجوی دکتری، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۲- دانشیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۳،۴- استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۴۶۰۰، پست الکترونیکی: zeinoddini52@mut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۱۹

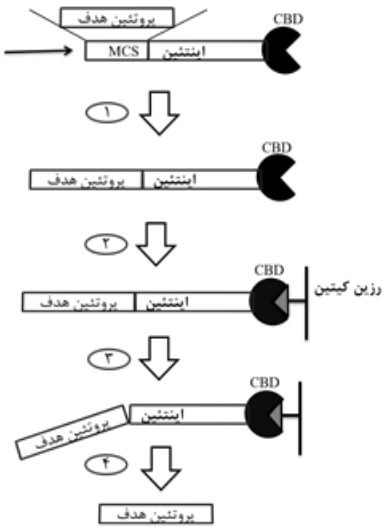
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

مقدمه

پیرایش پروتئین‌ها(Protein splicing) اولین بار در سال ۱۹۹۰ پس از مطالعات بر روی VMA1، یکی از زیر واحدهای پروتئین ATPase واکوئلی در مخمر ساکارومایسس سرویزیه، کشف گردید. نواحی انتهایی VMA1 مخمری دارای حفظ شدگی بالایی در مقایسه با همولوگ آن در میکروارگانیسم‌های دیگر است، در حالی که بخش مرکزی آن فاقد این حفظ شدگی است. مطالعات بیشتر نشان داد که طول کامل mRNAکدکننده VMA1 ترجمه می‌شود ولی پس از ترجمه بخش مرکزی آن از پلی‌پپتید پیش‌ساز حذف خواهد شد. بر اساس این مشاهدات و یافته‌های بعدی، پیرایش پروتئین‌ها به عنوان یک فرآیند مولکولی معرفی گردید که مشابه با پیرایش mRNA در سطح بیان ژن عمل می‌کند. در فرآیند پیرایش پروتئین‌ها برخی ترادف‌های پروتئینی نقش دارند که به عنوان بخش درونی پروتئین یا همان اینتئین (Intein) شناخته می‌شوند. این ترادف‌ها، که معادل اینترون‌ها در توالی mRNA نابالغ هستند، در واقع بدون اینکه به هیچ کوفاکتور یا آنزیم دیگری نیاز داشته باشند دارای قابلیت خودبرشی بوده و از این نظر پیرایش پروتئین‌ها با تمام فرآیندهای پس از ترجمه‌ای تفاوت دارد(۱،۲).

مطالعه پیرایش پروتئین‌ها و اینتئین‌ها هم از لحاظ علمی و هم از لحاظ کاربردی مورد توجه قرار دارد: به عنوان مثال مقایسه ترادف اینتئین‌ها باعث شناسایی دومین‌های حفظ شده در اینتئین‌های مختلف گردید که در عملکرد آن‌ها دارای اهمیت است(۳)، از سوی دیگر از همان ابتدای کشف پیرایش پروتئین‌ها و نقش اینتئین‌ها در این فرآیند مولکولی، تحقیقات زیادی با هدف شناسایی کاربردهای آن در بیوتکنولوژی انجام گرفت. یکی از اولین و مهم‌ترین کاربرد اینتئین‌ها بر اساس گسترش دنباله‌های تمایلی خودبرشی به منظور بازیابی سریع‌تر پروتئین‌های هدف خالص در سیستم‌های بیانی است(۴،۵).

هر دنباله اینتئنی دارای یک بخش تمایلی(نظیر دومین اتصال یابنده به کیتین) برای تخلیص تمایلی پروتئین تلفیقی و یک بخش اینتئنی است که در فعالیت خودبرشی القا شده نقش دارد(شکل ۱). در سیستم‌های مختلف، القای برش با استفاده از عوامل مختلفی انجام می‌گیرد تا پروتئین هدف از دنباله اینتئینی جدا گردد. در تمام سیستم‌های تخلیص وابسته به اینتئین‌ها، یکی از چالش‌های اصلی کاهش برش دنباله در هنگام بیان پروتئین و برش سریع آن پس از بیان و در زمان تخلیص پروتئین است(۶،۷). این سیستم‌ها از روش‌های مختلفی به منظور القای فرآیند خودبرشی اینتئین‌ها استفاده می‌کنند که مهم‌ترین این روش‌ها شامل شیب دما، شیب pH و استفاده از عوامل کاهش دهنده، نظیر دی تیوتریتول (DTT) یا β- مرکاپتواتانول است(۸).



شکل ۱: تصویری شماتیک از ساختار و مراحل عملکرد دنباله اینتئینی. (۱) توالی پروتئین هدف در تلفیق با دنباله اینتئینی بیان می‌گردد(۲). فرآیند ستون‌گذاری بر ستون حاوی رزین کیتین انجام می‌گیرد(۳). فرآیند خودبرشی در ستون تخلیص القا می‌شود(۴). پروتئین هدف پس از شستشو از ستون خارج خواهد شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

بر اساس اهمیت اینتئین‌ها به منظور تخلیص پروتئین‌ها، در تحقیق حاضر، دنباله اینتئینی با پروتئین نوترکیبی تلفیق گردید که در درمان سرطان کاربرد دارد. سرطان به عنوان یکی از معضلات جامعه پزشکی، همه ساله افراد زیادی را مبتلا کرده و موجب مرگ و میر زیادی نیز شده است. یکی از استراتژی‌های جدید در درمان سرطان، استفاده از پروتئین‌های توکسینی هدف گذاری شده بر علیه گیرنده‌های سطحی این سلول‌هاست، که به نام ایمونوتوکسین(Immunotoxin) معروف هستند. ایمونوتوکسین، پروتئین هیبریدی مشتمل بر دو جزء پروتئینی است. یک بخش به عنوان لیگاند عمل کرده و سلول‌های سرطانی را شناسایی می‌کند و بخش دوم نقش سیتوتوکسیک داشته و سبب مرگ سلول سرطانی می‌گردد (۱۲-۹). یکی از ایمونوتوکسین‌هایی که در درمان بیماران با لنفومای پیشرفته و یا بیماران با امکان عود مجدد بیماری استفاده می‌شود، دارویی است که با نام دنیلوکین دیفتیتوکس(DenileukinDiftitox) و یا به عنوان تجاری اونتاک(Ontak) شناخته می‌گردد. اونتاک محصول فناوری DNA نوترکیب و در سال ۱۹۹۹ تولید گردید و پس از اخذ تائیدیه سازمان غذا و داروی آمریکا(FDA) توسط شرکت Eisai در دسترس قرار گرفته است(۱۴،۱۳).

در تحقیق قبلی، توالی کدکننده اونتاک از پایگاه بین‌المللی بانک دارو(http://www.drugbank.ca/drugs/DB00004) گرفته شد و تلفیق این توالی با دنباله هیستیدینی و همسانه‌سازی در وکتور بیانی pET-21a و نیز آنالیزهای اولیه عملکرد انجام گرفت(۱۵). به منظور تولید سازه نوترکیب که در بیان پروتئین و حذف تک مرحله‌ای دنباله اینتئینی کاربرد داشته باشد، در مطالعه کنونی، این توالی در تلفیق با دنباله اینتئینی۲۸~ کیلودالتونی MxeGyrA و همراه یک دومین اتصال یابنده به کیتین در وکتور بیانی pTXB1 همسانه‌سازی گردید و بررسی میزان بیان پروتئین اونتاک به صورت تلفیق با دنباله اینتئینی(INT- CBD) و مقایسه بیان آن در حالت هیبریدی با دنباله هیستیدینی با موفقیت انجام گرفت تا در تحقیقات بعدی تخلیص تک‌مرحله‌ای برای تولید پروتئین دارویی اونتاک ارزیابی گردد.

روش بررسی

همسانه‌سازی توالی کدکننده اونتاک

به منظور همسانه‌سازی توالی کدکننده اونتاک درون پلاسمید بیانی pTXB1 (شرکت Biolab، NEB #N6707) ابتدا پرایمرهای اختصاصی و مناسب طراحی گردیدند(جدول ۱). در این پرایمرها، جایگاه برش آنزیم NdeI برای پرایمر پیشرو(Forward) و جایگاه برش آنزیم SapI برای پرایمر پیرو(Reverse) در نظر گرفته شدند تا از اضافه شدن هرگونه اسیدآمینه اضافی به توالی پروتئین دارویی جلوگیری گردد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مذکور و نیز پلاسمید pET- IDZ (محتوی توالی کدکننده اونتاک در تلفیق با دنباله پلی‌هیستیدینی) به عنوان الگو و توسط آنزیم Pfu (AccuPower® Pfu PCR PreMix، شرکت Bioneer) انجام شد. پس از آماده‌سازی محصول PCR، هضم آنزیمی توسط دو آنزیم SapI و NdeI صورت گرفت تا انتهای چسبنده مناسب تولید گردد. غلظت مناسب از پلاسمید pTXB1 نیز با این دو آنزیم خطی شد و سپس هر یک از محصولات واکنش‌های هضم آنزیمی بالا، پس از الکتروفورز، از ژل آگارز تخلیص شدند. واکنش الحاق بر اساس نسبت مناسب از غلظت‌های پلاسمید برش خورده و قطعه توالی اونتاک توسط آنزیم T4 لیگاز انجام گرفت تا پس از الحاق قطعه توالی اونتاک با پلاسمید pTXB1، پلاسمید نوترکیب pTX- IDZ به دست آید.

جدول۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی
F-IDZ	5′- GGTGGTCATATGGGTGCTGACGACGTTGTTGACTC- 3′
R-IDZ	5′- GGTGGTTGCTCTTCCGCAGGTCAGGGTTGAGATGATAGAC - 3′

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

جهت شناسایی و تائید کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب دو روش زیر انجام شد:

۱- اجرای PCR بر روی کلونی‌های به دست آمده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) تا حضور قطعه مورد نظر در کلونی‌ها ارزیابی گردد(شکل ۱- الف).

۲- هضم دو آنزیمی پلاسمیدهای حاصل از کلون‌های ۱ و ۵ با استفاده از آنزیم‌های NdeI و BamHI و هضم یک آنزیمی با استفاده از آنزیم AgeI صورت گرفت تا حضور این قطعه در پلاسمیدها تائید شود. لازم به توضیح است پس از همسانه‌سازی، جایگاه برش آنزیم SapI حذف می‌گردد(شکل ۱- ب).

ارزیابی بیان پروتئین اونتاک

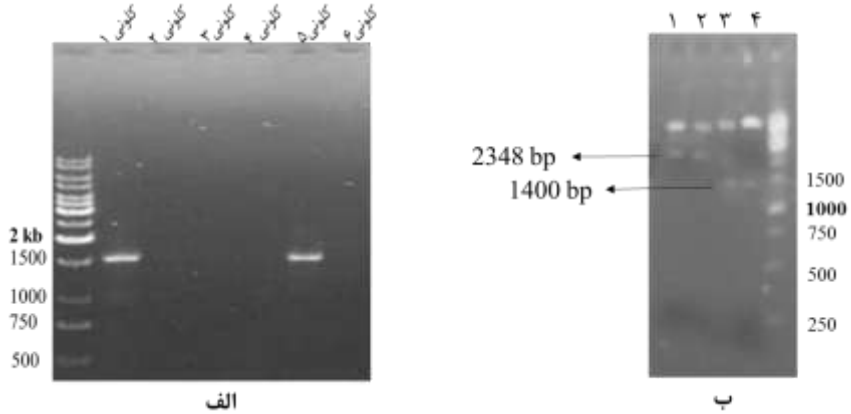
پلاسمیدهای نوترکیب pTX-IDZ ابتدا به باکتری‌های مستعد بیانی، سویه ER2566 انتقال یافتند. القای بیان پروتئین در OD 0.7 و با استفاده از IPTG غلظت ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بیان پروتئین مورد نظر ۴ ساعت پس از القا به کمک روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات(با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال، anti- CBD، خریداری شده از شرکت BioLab، NEB#S6651) ارزیابی گردید. به منظور مقایسه نتایج بیان پروتئین اونتاک در سازه pTX-IDZ نسبت به بیان آن در سازه pET-IDZ، به طور هم‌زمان، تمام شرایط بالا برای این سازه نیز انجام گرفت.

نتایج

ساخت سازه pTX-IDZ

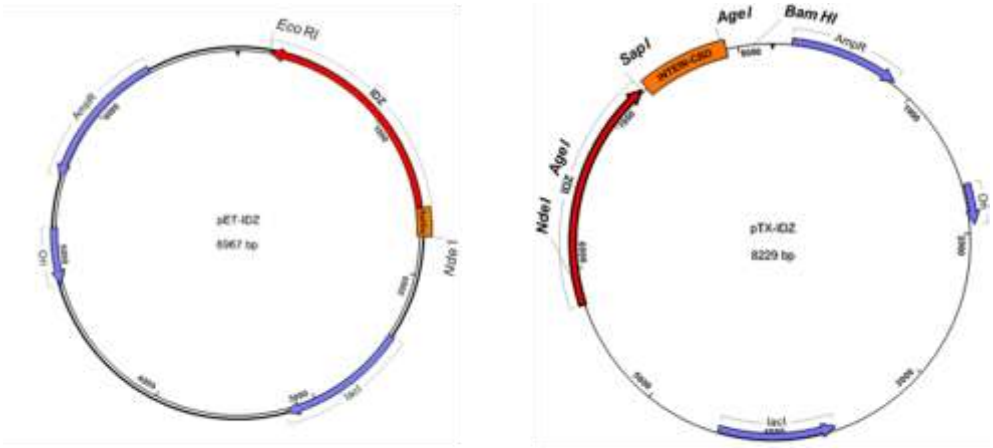
محصول واکنش PCR با استفاده از الگوی pET-IDZ(شکل ۲- الف) و پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) دارای طول تقریبی ۱۵۶۰ جفت بازی بود که اختصاصیت و طول آن بر روی ژل آگارز تائید گردید. در مطالعه قبلی توالی کدکننده اونتاک در تلفیق با دنباله هیستیدینی درون پلاسمید بیانی pET21a کلون شده بود، ولی در این مطالعه طراحی پرایمرهای اختصاصی به صورتی انجام گرفت تا این دنباله هیستیدینی حذف گردد. همچنین جایگاه‌های آنزیمی NdeI و SapI نیز به منظور همسانه سازی محصول PCR در وکتور بیانی pTXB1 مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله بعد همین پرایمرها به منظور شناسایی کلون‌های صحیح استفاده شدند. از بین شش کلونی که مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج واکنش PCR مربوط به دو کلونی مثبت بود(شکل ۲- الف) و به همین علت این کلونی‌ها برای ارزیابی و تائید ساخت سازه pTX-IDZ انتخاب شدند.

تائید ساخت سازه pTX-IDZ بر اساس نقشه جایگاه‌های آنزیمی پلاسمید pTXB1 و نیز توالی قطعه کدکننده اونتاک انجام شد. در واکنش هضم دو آنزیمی(BamHI و NdeI) خروج قطعه‌ای با طول تقریبی ۲۳۴۸ جفت بازی(مجموع طول قطعه توالی کدکننده اونتاک و دنباله اینتئینی) نشان دهنده صحت فرآیند همسانه‌سازی بود. در واکنش هضم تک آنزیمی(AgeI) نیز قطعه با طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز خارج گردید که برابر مجموع طول بخشی از قطعه توالی کدکننده اونتاک و بدنه وکتور بود(شکل ۲-ب). بر این اساس ساخت سازه ژنی pTX-IDZ ، تائید گردید(شکل ۳- ب).



شکل۲. الف) شناسایی کلونی‌های نوترکیب کاندید بر اساس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی. ب) تأیید پلاسمیدهای نوترکیب pTX-IDZ بر اساس هضم دو آنزیمی با آنزیم‌های NdeI و BamHI (چاهک‌های ۱ و ۲) و هضم یک آنزیمی با آنزیم AgeI (چاهک‌های ۳ و ۴).

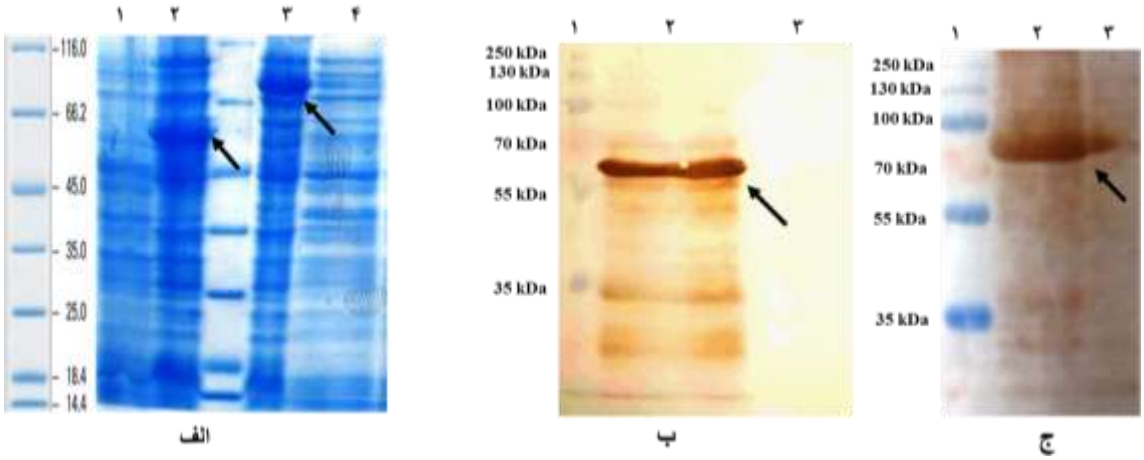
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]



شکل ۳: الف) نقشه ژنی سازه pET-IDZ. ب) نقشه ژنی سازه pTX-IDZ .

بیان پروتئین هیبریدی IDZ-INT-CBD

بیان سازهpTX-IDZ در سویه بیانی ER2566 مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان پروتئین در زمان صفر و ۴ ساعت پس از القا و با استفاده از SDS-PAGE انجام شد(شکل ۴-الف). آنالیز بیان با استفاده از نرم‌افزار Image J، بیان ۹ درصدی پروتئین اونتاک را پس از القا در سازه pTX-IDZ نشان می‌داد، در حالی که بیان پروتئین اونتاک در سازه pET-IDZ، با شرایط مشابه القا، ۱۲ درصد ارزیابی شده بود. همچنین وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونو کلونال anti-His (شکل ۴- ب) و آنتی بادی پلی کلونال anti-CBD (شکل ۴-ج) منظور ارزیابی صحت بیان انجام گرفت. پروتئین اونتاک دارای وزن مولکولی ۵۸ کیلودالتون است، ولی در تلفیق با دنباله اینتئینی انتظار می‌رود تا پروتئینی با وزن مولکولی ۸۶~ کیلودالتون بیان شود. بنابراین، با مشاهده باند ۸۶~ کیلودالتونی، بیان پروتئین هیبریدی IDZ-INT-CBD تائید گردید. همچنین مقایسه نتایج بیان سازه pTX-IDZ (تلفیق شده با دنباله اینتئینی) با سازه pET-IDZ (تلفیق شده با دنباله هیستیدینی) نشان دهنده عدم کاهش بیان در پروتئین هیبریدی مذکور با وجود افزایش اندازه پروتئین اولیه است.



شکل ۴: الف) آنالیز و مقایسه بیان پروتئین اونتاک در دو حالت تلفیق شده با دنباله هیستیدینی و دنباله اینتئینی. زمان صفر القا (چاهک ۱ و ۴)، بیان پروتئین اونتاک به صورت تلفیق شده با دنباله هیستیدینی ۴ ساعت پس از القا (چاهک ۲)، بیان پروتئین اونتاک به صورت تلفیق شده با دنباله اینتئینی ۴ ساعت پس از القا (چاهک ۳). ب) تأیید بیان با وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال، anti- His (چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی، چاهک ۲: بیان پروتئین بعد از القا، چاهک ۳: بیان پروتئین قبل از القا). ج) آنالیز بیان با وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال anti -CBD (چاهک ۱: مارکر وزن مولکولی، چاهک ۲: بیان پروتئین بعد از القا، چاهک ۳: بیان پروتئین قبل از القا).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

بحث

در حال حاضر، بسیاری از پروتئین‌های دارویی به وسیله تکنولوژی DNA نوترکیب تولید می‌شوند. تکنولوژی DNA نوترکیب دارای قابلیت‌های مختلفی است، ولی یکی از مزیت‌های مهم آن، تسهیل تولید پروتئین‌هایی با عملکرد و فعالیت مناسب است. به طوری که ۲۵ سال پس از دریافت تائیدیه FDA برای اولین پروتئین دارویی نوترکیب(انسولین) ، افزایش چشمگیری در تعداد پروتئین‌های دارویی مشاهده شد، و در حال حاضر بیش از ۱۳۰ پروتئین دارویی وجود دارد(آمار مربوط به سال ۲۰۰۸) که اغلب آن‌ها با روش‌های DNA نوترکیب تولید شده‌اند و مورد تائید سازمان غذا و داروی آمریکا(FDA) هستند(۱۶،۱۷). یکی از گروه‌های مهم پروتئین‌های دارویی ایمونوتوکسین‌ها هستند که مثال مهم و موفق از این داروها، دارویی تحت عنوان DenileukinDeftitox (نام تجاری: اونتاک) است(۱۸). این دارو نمونه‌ای از پروتئین‌های دارویی نوترکیب است که با موفقیت برای مقاصد درمانی بکار می‌رود. اگرچه تعداد خیلی بیشتری از داروهای پروتئینی بالقوه وجود دارند که به علت برخی چالش‌ها موفقیت لازم برای کسب تائیدهای دارویی را کسب نمی‌کنند(۱۹،۲۰)، پایداری و بازدهی تولید داروهای پروتئینی نظیر ایمونوتوکسین‌ها از عوامل مهمی هستند که در موفقیت تجاری و درمانی آن‌ها نقش دارند(۲۱). یکی از اهداف تحقیقات مختلف نیز بررسی کاربرد روش‌های مختلف در بهبود تخلیص داروهای پروتئینی و افزایش بازدهی تولید دارو با کاهش مدت زمان و کاهش هزینه‌هاست. روش‌های مختلفی برای تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب توسعه یافته‌اند، در این میان استفاده از دنباله یا اینتئین، یک روش نوین جهت تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به حساب می‌آید که در حدود ۲۵ سال است در قالب ایده پیرایش پروتئین اولیه در تولید پروتئین بالغ، مشابه پیرایش mRNAمطرح گردیده است(۲۲،۱،۲). مهم‌ترین ویژگی روش‌های تخلیص مبتنی بر اینتئین‌ها قابلیت القای عملکرد خودبرشی و تخلیص پروتئین در یک مرحله است، به طوری که از روش‌های اخیر تحت عنوان روش‌های فوق سریع در تخلیص پروتئین نوترکیب(Split Intein mediated ultra-Rapid Purification (SIRP) نام می‌برند(۲۳).

در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی انتشار یافته است که از دنباله‌های اینتئینی در حالت‌های مختلف همراه با دومین اتصال یابنده به کیتین(CBD)، پروتئین شبه الاستین(ELP) و دومین اتصال یابنده به پلی هیدروکسی بوتیرات(Phasin) به منظور تخلیص پروتئین‌های مختلف نوترکیب استفاده کرده‌اند(۲۷-۲۴). در تحقیق حاضر نیز با هدف راه‌اندازی روش مذکور در تخلیص پروتئین اونتاک، قطعه توالی کدکننده این پروتئین در تلفیق با دنباله اینتئینی همراه با دومین اتصال یابنده به کیتین(INT-CBD) در وکتور pTXB1 همسانه‌سازی گردید.

نتیجه‌گیری

بر اساس مقایسه‌ای بیانی که در سازه جدید(همراه با دنباله اینتئین) با نمونه بدون اینتئین انجام گرفت، بیان پروتئین در هر دو سازه مطلوب ارزیابی گردید. به بیان دیگر تولید نوترکیب اونتاک در قالب هیبریدی با INT و CBD که سبب افزایش اندازه پروتئین به میزان ۲۸ کیلودالتون می‌شود، اثر منفی بر تولید اولیه این پروتئین نداشته است. بر اساس این نتایج، با بیان پروتئین در مقیاس بالا، روش‌های مختلف به منظور القای فرآیند خودبرشی دنباله اینتئینی ارزیابی خواهد شد که مهم‌ترین این روش‌ها شامل شیب دما، شیب pH و استفاده از عوامل کاهش‌دهنده، نظیر دی تیوتریتول(DTT) یا β- مرکاپتواتانول هستند. همچنین، در مطالعات بعدی با استفاده از این روش‌های مختلف القای فرآیند خودبرشی، به تحقیقات بیشتری نیاز است تا ساختار و عملکرد پروتئین با روش‌های مختلف آزمایشگاهی بررسی گردد و نیز میزان خلوص پروتئین حاصل در مقایسه با نمونه تجاری مورد ارزیابی قرار گیرد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

References:

1- Elleuche S, Pöggeler S. ***Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology.*** App microbio biotechno 2010; 87(2): 479-89.

2- Chong S, Shao Y, Paulus H, Benner J, Perler FB, Xu M-Q. ***Protein Splicing Involving the Saccharomyces cerevisiae VMA Intein The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system.*** J Biological Chemistry 1996; 271(36): 22159-68.

3- Klabunde T, Sharma S, Telenti A, Jacobs WR, Sacchettini JC. ***Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing.*** Nature Structural & Molecular Biology 1998; 5(1): 31-6.

4- Wood DW, Camarero JA. ***Intein applications: from protein purification and labeling to metabolic control methods.*** J Biologic Chemistry 2014; 289(21): 14512-519.

5- Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, et al. ***Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.*** Gene 1997; 192(2): 271-81.

6- Chong S, Montello G, Zhang A, Cantor EJ, Liao W, Xu M-Q, et al. ***Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step.*** Nucleic acids Res 1998; 26(22): 5109-15.

7- Southworth MW, Amaya K, Evans TC, Xu M-Q, Perler FB. ***Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein.*** Biotechniques 1999; 27(1): 110-04.

8- Li Y. ***Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production.*** Biotechno letters 2011; 33(5): 869-81.

9- Kreitman RJ. ***Immunotoxins for targeted cancer therapy.*** The AAPS J 2006; 8(3): E532-E51.

10- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. ***Targeted toxins.*** Clinic cancer Res 2000; 6(2): 326-34.

11- Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. ***Immunotoxin treatment of cancer*.*** Annu Rev Med 2007; 58: 221-37.

12- Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. ***Immunotoxin therapy of cancer.*** Nature Reviews Cancer. 2006; 6(7): 559-65.

13- Kaminetzky D, Hymes KB. ***Denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma.*** Biologics: Targets & Therapy 2008; 2(4): 717-24.

14- Knobler E. ***Current management strategies for cutaneous T-Cell Lymphoma.*** Clinics in dermatology 2004; 22(3): 197-208.

15- Amraee M, Zeinodini M, Soleimani M, Saeedinia AR. ***Cloning, expression, purification and toxicity assessment of diphtheria toxin - interleukin 2 fusion protein.*** J Polic Med 2015; (2): 125-32. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

16- Armstrong AW, Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. ***Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy.*** 3rd edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 2008.

17- Mahmood I, Green MD. ***Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins.*** Clinic pharmacokinetics 2005; 44(4): 331-47.

18- Turturro F. ***Denileukin diftitox: a biotherapeutic paradigm shift in the treatment of lymphoid-derived disorders.*** Expert review anticancer therapy 2007; 7(1): 11-7.

19- Putney SD ,Burke PA. ***Improving protein therapeutics with sustained-release formulations.*** Nature biotechno 1998; 16(2): 153-57.

20- Ballantyne A, Dhillon S. ***Trastuzumab emtansine: first global approval.*** Drugs 2013; 73(7): 755-65.

21- Cunningham D, Humblet Y, Siena S ,Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. ***Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.*** New England J Med 2004; 351(4): 337-45.

22- Gogarten JP, Senejani AG, Zhaxybayeva O, Olendzenski L, Hilario E. ***Inteins: structure, function, and evolution.*** Annual Rev Microbio 2002; 56(1): 263-87.

23- Elleuche S, Döring K, Pöggeler S. ***Minimization of a eukaryotic mini-intein.*** Biochemical and biophysical Res commu 2008; 366(1): 239-43.

24- Naumann TA, Savinov SN, Benkovic SJ. ***Engineering an affinity tag for genetically encoded cyclic peptides.*** Biotechnology and bioengineering 2005; 92(7): 820-30.

25- Tavassoli A, Benkovic SJ. ***Split-intein mediated circular ligation used in the synthesis of cyclic peptide libraries in E. coli.*** Nature protocols 2007; 2(5): 1126-33.

26- Banki MR, Gerngross TU, Wood DW. ***Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate) PHB) matrix association.*** Protein Sci 2005; 14(6): 1387-95.

27- Shi C, Meng Q, Wood D. ***A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification.*** App Microbio Biotechno 2013; 97(2): 829-35.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]

Cloning and Expression of Ontak Immunotoxin Using Intein Tag

Seyed Ali Mosaveizadeh(PhD)[1], Mehdi Zeinoddini(PhD)[2*]
Ali Reza Saeedinia(PhD)[3], Mohammad Ali Nasiri Khalili(PhD)[4]

[1,2,3,4] *Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.*

Received: 6 Jan 2016 ***Accepted:*** 7 Apr 2016

Abstract

Introduction: Inteins (INT) are internal parts of a number of proteins in yeast and some other unicellular eukaryotes, which can be separated from the immature protein during protein splicing process. After identifying the mechanism of intein action, applications of these sequences are be considered in the single-step purification of recombinant proteins and different intein tags were developed. The most important advantage of using intein tags in purification of recombinant proteins than other affinity tags is no requirement of expensive protease enzymes and following additional steps to remove protease that make intein tags economically are considered more important. In the present study, denileukin diftitox immunotoxin (brand name Ontak), be fused with an intein tag and it was inserted in pTXB1 plasmid.

Methods: In this study, with respect to multiple cloning sites (MCS) of pTXB1, specific primers were designed. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed and encoding sequence of ONTAK was cloned using restriction sites of NdeI and SapI. Recombinant vector (PTX-IDZ) was transformed into E. coli strain ER2566 and expression of gene was studied.

Results: The accuracy of recombinant construct was confirmed by PCR and enzymatic digestion. The produced recombinant proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: Restriction site of SapI guarantees no additional residues incorporate in primary protein sequence. Also, the expression of this construct was analyzed in compare with fused protein to poly-His tag. According to the appropriate expression of fused protein in both constructs it was expected that one step-purification of considered drug protein will be success in the following steps.

Keywords: Intein; Immunotoxins; Cloning; Recombinant Proteins

This paper should be cited as:
Seyed Ali Mosaveizadeh, Mehdi Zeinoddini, Ali Reza Saeedinia, Mohammad Ali Nasiri Khalili. ***Cloning and expression of ontak immunotoxin using intein tag.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(3): 232-40.

****Corresponding author: Tel: 021-22974600, email: zeinoddini52@mut.ac.ir***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-29]