دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۶، صفحه ۱۱۷۵– ۱۱۶۸ (بهمن و اسفند ۱۳۹۳)

ISMJ 2015; 17(6): 1168-1175

کلون و بیان فوتوپروتئین اکورین با استفاده از دنباله اینتئین

الهه سادات سیدحسینی [۱]، مهدی زین‌الدینی [۱*]، جلیل فلاح [۱]، علی‌رضا سعیدی‌نیا [۱]

[۱]پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۳– پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۰)

چکیده

زمینه: اینتئین (INT) بخش‌های درونی پروتئین است که می‌تواند در طی فرایند پیرایش پروتئین، خود را از پروتئین نابالغ جداکند. این توالی برای جدا شدن، احتیاج به آنزیم یا کوفاکتور خاصی ندارد. از این توالی پروتئینی و ویژگی برش خود به خودی آن، در اثر اعمال تغییر دما، pH و یا القای تیولی در جهت تخلیص پروتئین استفاده می‌شود. مزیت این روش 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 تحقیق حاضر فوتوپروتئین اکورین به‌صورت ملکولی با INT هیبرید شده و میزان بیان آن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ژن رمز کننده اکورین که در مطالعات قبلی درون وکتور pET21a کلون شده بود با استفاده از پرایمرها و آنزیم‌های محدودگر اختصاصی درون وکتور pTYB21، که حاوی دنباله INT است، کلون گردید. سپس وکتور pTY-aequorin حاصله به باکتری E.coli سویه بیانی ER2566 انتقال داده شد و با تکنیک‌های الکتروفورز (Electerophoresis)، وسترن بلات (Western Blot) و تعیین ترادف (Sequencing)، صحت کلون‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: ژن به رمز درآورنده فوتوپروتئین اکورین بین جایگاه های آنزیمی SapI و PstI درون وکتور pTYB21 به‌صورت صحیح کلون گردید و بیان پروتئین هیبریدی اکورین- اینتئین با استفاده از روش‌های مرسوم تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: ساخت سازه ژنی فوتوپروتئین اکورین، در حالت هیبریدی و متصل به INT با استفاده از روش‌های ملکولی تأیید شد. همچنین میزان بیان اکورین در حالت متصل شده با INT، درصد بیان بیش از ۲۵ درصد مجموعه پروتئین‌های سلولی را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: اینتئین، پیرایش پروتئین، کلون، بیان، فوتوپروتئین اکورین.

*تهران، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

E-mail:zeinoddini52@mut.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

مقدمه

اینتئین(INT)[1] به معنی بخش درونی پروتئین است. این اصطلاح اولین بار در سال ۱۹۹۰ زمانی که دو گروه تحقیقاتی فعالیت گسترده‌ای را بر روی اضافه کردن قطعه‌ای درون ژن VMA1 آغاز کرده بودند مطرح شد. ژن مذکور به رمز درآورنده آنزیم ATPase غشایی از مخمر ساکارومایسیس سرویزیا است. ترادف نوکلئوتیدی ژن مذکور پیشگویی کننده پروتئینی با ۱۰۷۱ اسیدآمینه و وزنی حدود ۱۱۸ کیلودالتون است ولی اندازه واقعی پروتئین VMA1 در آزمایشات تکمیلی با استفاده از الکتروفورز، فقط ۶۷ کیلو دالتون به‌دست آمد. بر این اساس ایده پیرایش پروتئین[2] اولیه جهت تولید پروتئین بالغ مشابه پیرایش mRNA مطرح گردید. در نتیجه INT را معادل اینترون و اکستین[3] را معادل اگزون mRNA برای پروتئین اولیه تعریف کردند. اکستین بالا دستی به‌عنوان اکستین‌آمین[4] و اکستین پایین دستی به نام اکستین-کربوکسیل[5] نام‌گذاری شدند. به بیان دیگر فعالیت پس از ترجمه‌ای پروتئین اولیه که سبب حذف INT و اتصال N-Extein به C-Extein می‌شود را پیرایش پروتئین[6] می‌نامند که محصول این فرایند، پروتئین بالغ و INT می‌باشد (۶-۱).

این توالی‌ها حالت خودشکافنده دارند و در اثر تغییرات دما، pH و یا القای تیولی، از پروتئین هدف جدا می‌شوند که می‌توان از این خاصیت در جهت تخلیص یک مرحله‌ای پروتئین استفاده نمود. مزیت این روش نسبت به بقیه روش‌های تخلیص پروتئین عدم احتیاج به آنزیم‌های پروتئازی و مراحل حذف پروتئاز می‌باشد (۶ و ۷)، که این روش را از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌کند. بر این اساس وکتورهای تجاری pTXB1 و pTYB21 به بازار ارائه شده‌اند که در آن‌ها INT به دومین قابل اتصال به کتین[7] (CBD) فیوز شده است.

بر این اساس پس از بیان پروتئین هیبریدی مذکور، این پروتئین قابلیت اتصال به رزین‌های حاوی کیتین را داراست. پس از انجام کروماتوگرافی تمایلی، بر اثر کاهش دما یا القاء تیولی، پروتئین هدف بدون دنباله اضافه، از ستون شسته و خالص می‌گردد (۸ و ۹).

با توجه به اینکه خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب با درصد خلوص بالا، همواره از معضلات محققین فناوری زیستی است، اکثر محققین تمایل دارند با کمترین مراحل و در کوتاه‌ترین زمان به بالاترین درصد خلوص پروتئین دست یابند. لذا امروزه روش‌های متنوع و تک مرحله‌ای توسط دانشمندان ارائه شده است تا بر این معضلات چیره شوند (۱۲-۱۰). در این تحقیق به منظور ارزیابی کارایی روش تخلیص با INT، کلون و بیان فوتوپروتئین اکورین[8] درون وکتور pTYB21 که دارای توالی INT و CBD است، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

اکورین، به‌عنوان پروتئین نوترکیب مدل مورد استفاده قرار گرفت. اکورین، فوتوپروتئینی است که اولین بار در نوعی عروس دریایی به‌نام Aequoera victoria شناسایی شد، که قادر است از خود نور آبی رنگ ساطع نماید. به‌دلیل حساسیت بالای اکورین به غلظت کلسیم و با توجه به اینکه در این

[1] Intein (Internal Protein)
[2] Protein Splicing
[3] External Protein
[4] N-Extein
[5] C-Extein
[6] Protein Splicing
[7] Chitin Binding Domain
[8] Aequorin Photoprotein

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

پروتئین، درصد سیگنال نسبت به نویز پس زمینه، بسیار بالا است، از این فوتوپروتئین در حوزه‌های مختلف زیست فناوری استفاده‌های زیادی می‌شود (۱۵-۱۳). از جمله کاربردهای اکورین در زیست فناوری می‌توان به استفاده از آن به‌عنوان نشانگر غلظت کلسیم (۱۶)، طراحی کیت‌های سنجش ایمنی (۱۷ و ۱۸)، طراحی حس‌گرهای سلولی (۱۹) و حتی مکمل غذایی جهت بیماران آلزایمری (۲۰ و ۲۱) اشاره نمود. هدف تحقیق حاضر بررسی میزان بیان پروتئین اکورین در حالت هیبرید شده با پروتئینی ۵۶ کیلو دالتونی (INT-CBD) و مقایسه میزان بیان با اکورین در حالت هیبریدی با دنباله هیستیدین است. تا در صورت موفقیت‌آمیز بودن کلون و بیان آن، در مطالعات بعدی عملکرد خود شکافندگی INT مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کلونینگ ژن به رمز درآورنده اکورین درون پلاسمید pTYB21

به‌منظور کلون ژن رمز کننده فوتوپروتئین اکورین درون وکتور pTYB21 (خریداری شده از شرکت BioLab، NEB#N6701)، ابتدا پرایمرهای اختصاصی به‌منظور تکثیر قطعه ژنی به همراه جایگاه‌های برش آنزیمی محدودگر مناسب طراحی گردید (جدول ۱). در پرایمرهای مربوطه جایگاه برش SapI در پرایمر پیشرو (Forward primer) و جایگاه برش PstI در پرایمر پیرو (Reverse Primer) طراحی گردید. بر این اساس بین پروتئین اکورین و INT اسیدآمینه اضافی تشکیل نخواهد شد. در مرحله بعد پلاسمید pET-aequorin که حاوی ژن به رمز درآورنده اکورین است (۲۲)، به‌عنوان الگو در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور مورد استفاده قرار گرفت.

لازم به توضیح است که PCR ابتدا با آنزیم پلیمراز Taq و سپس با آنزیم پلیمراز Pfu، انجام شد. در ادامه هضم آنزیمی محصول PCR توسط دو آنزیم SapI و PstI صورت گرفت و دو انتهای چسبنده در ژن ایجاد شد، همچنین پلاسمید pTYB21 نیز توسط این دو آنزیم خطی شده و انتهای چسبنده در دو طرف آن ایجاد شد. پس از تخلیص ژن رمز کننده اکورین از روی ژل آگارز، قطعه مورد نظر در یک واکنش توسط آنزیم T4 به داخل پلاسمید بیانی pTYB21 انتقال یافت تا پلاسمید pTY- aequorin به‌دست آید. جهت تأیید کلون دو مسیر زیر انجام شد:

۱) هضم دو آنزیمی پلاسمید pTY- aequorin با استفاده از دو آنزیم NheI و PstI صورت گرفت. لازم به توضیح است که پس از کلون ژن به رمز درآورنده اکورین در پلاسمید pTYB21، جایگاه برش آنزیم SapI از بین می‌رود و نمی‌توان از این آنزیم جهت تأیید کلون استفاده نمود. بر اساس نقشه پلاسمیدی pTY-aequorin (شکل ۲)، محصول این هضم آنزیمی، قطعه هیبریدی CBD–INT–aequorin است.

۲) با استفاده از پرایمرهای عمومی T7، تعیین ترادف ژنی صورت گرفت.

جدول ۱) توالی و اندازه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی	اندازه (bp)
F-TYaeq	5′-GGTGGTTGCTCTTCCAACCTGTACGATGTACCAGATTATGCATC-3′	۴۴
R-TYaeq	5′-GGTGGTCTGCAGTCATGGTACCGCGCCGCCGTACAG -3′	۳۶

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

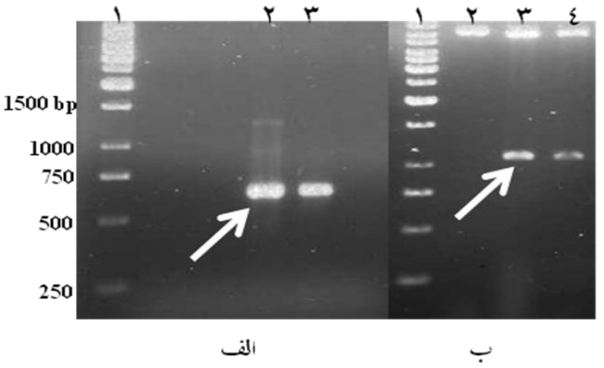
ارزیابی بیان اکورین

پس از ساخت سازه ژنی pTY- aequorin، پلاسمید مربوطه درون باکتری مستعد شده ER2566، انتقال یافت. در ادامه القای بیان در OD۰/۷ با یک میلی مولار از IPTG[9] در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (جهت افزایش پروتئین‌های محلول) به‌مدت ۴ ساعت انجام شد. در ادامه بیان پروتئین اکورین به کمک روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات (با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال، anti-CBD، خریداری شده از شرکت BioLab، NEB#S6651)، ارزیابی گردید. در نهایت نیز میزان بیان فوتوپروتئین اکورین در حالت هیبرید شده با INT و CBD با بیان فوتوپروتئین اکورین اولیه (pET-aequorin) مقایسه شد.

یافته‌ها

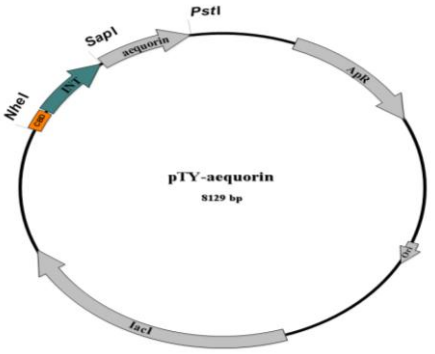
ساخت سازه ژنی pTY-aequorin

پس از انجام واکنش PCR، با استفاده از الگوی pET-aequorin، پرایمرهای F-TY.aeq، R-TY.aeq و آنزیم پلیمراز Pfu، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت که تکثیر باند حدود ۶۵۰ بازی، تأیید کننده تکثیر توالی ژنی اکورین می‌باشد (شکل ۱- الف) (۲۲). به منظور ساب کلون ژن به رمز درآورنده اکورین درون پلاسمید pTYB21، محصول PCR مرحله قبل و پلاسمید پایه pTYB21، با دو آنزیم محدودگر SapI و PstI برش و سپس با آنزیم لیگاز، کلون گردید. در این مرحله سه کلونی انتخاب گردید و به منظور تأیید کلون‌های حاصله، هضم دو آنزیم پلاسمید pTY-aequorin با استفاده از آنزیم‌های PstI و NheI که دارای سایت برش درون پلاسمید pTYB21 بوده ولی برروی توالی ژن کلون شده جایگاه ندارد، انجام شد (به‌علت از بین رفتن سایت برش آنزیم SapI پس از کلونینگ، نمی‌توان از آن در جهت بررسی کلونینگ استفاده کرد) (شکل ۱- ب).



شکل ۱) الف- آنالیز محصول PCR با پرایمرهای R-TY.aeq، F-TY.aeq و پلاسمید pET-aequorin به‌عنوان الگو، صورت گرفته با آنزیم pfu، ۱) Ladder 1 kb، ۲ و ۳) محصول PCR در دمای ۶۰ و ۵۷ درجه سانتی‌گراد. ب- تأیید کلون aequorin در وکتور pTYB21: ۱) Ladder 1kb، ۲) محصول هضم آنزیمی پلاسمید pTY-aequorin، کلون اول، ۳) کلون دوم، ۴) کلون سوم

بر اساس نقشه پلاسمیدی pTYB21(NEB#N6701) و pTY-aequorin خروج قطعه حدود ۱۳۵۰جفت بازی از کلون‌های دوم و سوم، نشانه‌ای بر تأئید کلونینگ می‌باشد (مجموع قطعه‌ی کلون شده حدود ۶۵۰ جفت بازی و بدنه وکتور حدود ۷۰۰ جفت بازی برش خورده می‌باشد). در نهایت نیز پلاسمید مربوطه به شرکت ژن فناوران جهت انجام تعیین ترادف ژنی منتقل گردید که نتایج به‌دست آمده صحت سازه ژنی pTY-aequorin را نشان داد (شکل ۲).



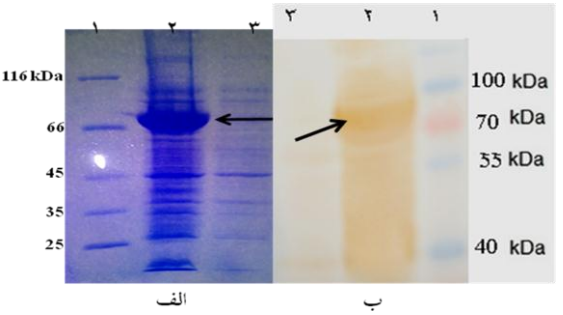
شکل ۲) سازه ژنی pTY-aequorin

[9] Isopropyl β–D-1-Thiogalactopyranoside

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

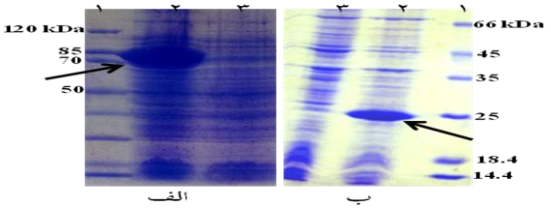
بیان پروتئین هیبریدی اکورین- CBD-INT

بعد از تأیید ملکولی سازه ژنی ساخته شده، پلاسمید pTY-aequorin به درون باکتری ER2566 انتقال یافته و القاء شد. بررسی بیان پروتئین در زمان‌های صفر و ۴ ساعت بعد از القاء با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات صورت گرفت که مشاهده باند حدود ۷۹ کیلو دالتونی تأئید کننده بیان فوتوپروتئین اکورین همراه با INT و CBD می‌باشد (شکل ۳)، که در آن وزن مولکولی INT و CBD حدود ۵۶ کیلودالتون و وزن مولکولی پروتئین اکورین حدود ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد (۲۲ و ۲۳).



شکل ۳) آنالیز بیان پروتئین اکورین با استفاده از دو روش SDS-PAGE (الف) و وسترن بلات (ب). ۱) مارکر وزن ملکولی، ۲) باکتری نوترکیب بعد از القاء، ۳) باکتری نوترکیب قبل از القاء

با توجه به افزایش اندازه نمونه پروتئین هیبریدی بیان شده در پلاسمید pTY-aequorin، جهت ارزیابی و مقایسه میزان بیان پروتئین، تولید اکورین در حالت فیور شده به دنباله هیستیدین (pET-aequorin) و CBD-INT (pTY-aequorin)، با یکدیگر مقایسه شد که مطابق شکل ۴، بیان اکورین در حالت فیوز شده با INT کاهشی را نشان نداده، بلکه بیشتر نیز شده بود. مطابق شکل ۴، اکورین در حالت اولیه (فیور شده به دنباله هیستیدین) باندی در حدود ۲۳ کیلودالتون (شکل ۴- ب) و در حالت فیوز شده با CBD-INT، باندی در حدود ۷۹ کیلو دالتون را نشان می‌داد (شکل ۴- الف).



شکل ۴) مقایسه بیان فوتوپروتئین اکورین در دو حالت فیوز شده به دنباله INT (الف) و هیستیدین (ب). ۱) مارکر وزن ملکولی، ۲) زمان ۴ ساعت بعد از القا، ۳) زمان صفر قبل از القا

بحث

در بین روش‌های مختلف تخلیص پروتئین‌های نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی[10] با دارا بودن مزیت‌های زیاد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از سوی دیگر بین روش‌های تمایلی، استفاده از دنباله هیستیدین، با توجه به سادگی روش و افزودن تعداد کم اسیدآمینه به پروتئین هدف، از سایر روش‌ها ارجحیت بیشتری داشته و بیشتر مورد علاقه محققین فناوری زیستی قرار گرفته است (۲۴). در این میان استفاده از دنباله اینتئین، یک روش نوین جهت تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به حساب می‌آید که در حدود ۲۰ سال است در قالب ایده پیرایش پروتئین اولیه در تولید پروتئین بالغ، مشابه پیرایش mRNA، مطرح گردیده است (۶-۱). متخصصان مهندسی ژنتیک با الگوبرداری از این مکانیسم خود شکافندگی طبیعی INT درون سلولی، توانسته‌اند وکتورهای تجاری ارائه دهند که به پروتئین نوترکیب هدف، دنباله INT به همراه CBD متصل می‌کند. براین اساس یک روش ساده تمایلی (برمبنای ستون‌های کتین) در جهت

[10] Affinity Chromatography

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

تخلیص و تولید پروتئین‌های نوترکیب، بدون نیاز به روش‌های بعدی به منظور حذف دنباله متصل شده، به‌دست می‌آید. مهم‌ترین ویژگی دنباله INT در تولید پروتئین‌های نوترکیب، قابلیت خودشکافندگی آن، بدون اضافه شدن اسیدآمینه به انتهای پروتئین هدف است. در نتیجه در این روش نیاز به آنزیم پروتئاز و انجام مراحل پیچیده و وقت‌گیر برای حذف آنزیم از پروتئین هدف، نمی‌باشد. به بیان دیگر، استفاده از این روش علاوه‌بر کاهش زمان و هزینه مسیر تولید پروتئین نوترکیب، باعث افزایش بازده نهایی محصول نیز می‌گردد (۱۱–۷). امروزه تعداد مقالاتی که در آن‌ها از این روش جهت تخلیص پروتئین‌های نوترکیب استفاده شده، رشد زیادی کرده است. در مقالات متعدد، اهمیت استفاده از دنباله INT در تولید پروتئین‌های نوترکیب در شکل‌های مختلف متصل شده به CBD، پروتئین شبه الاستین (ELP) و phasin (دومین اتصالی به پلی‌هیدروکسی بوتیرات، PHB) (Poly Hydroxy Butyrate) ارائه شده است (۲۹–۲۵). همچنین از این روش به‌عنوان روشی فوق سریع در خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب (SIRP) (Split intein mediated ultra rapid purification) نام می‌برند (۳۰).

در تحقیق حاضر به‌منظور راه‌اندازی روش مذکور، کلون و بیان پروتئین اکورین در وکتور حاوی دنباله INT (pTYB21) انجام گرفت و بیان پروتئین هیبریدی با نمونه بدون دنباله INT، مقایسه شد. لازم به توضیح است که دنباله‌های INT خود به دو نوع بزرگ (Large Intein) و کوچک (Mini Intein) تقسیم می‌شوند (۳۱ و ۳۲) که در این تحقیق از وکتور pTYB21 که دارای دنباله INT بزرگ ۵۰ کیلودالتونی و CBD ۶ کیلودالتونی بود (۲۳)، استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده شد اتصال مولکولی و افزایش اندازه پروتئین از ۲۳ کیلو دالتون به ۷۹ کیلودالتون، نه تنها باعث کاهش بیان پروتئین مذکور نشد، بلکه میزان بیان به میزان محسوسی افزایش یافت که نشان دهنده عدم وجود نقش منفی استفاده از دنباله‌های پپتیدی بلند (نظیر INT) در کاهش بیان پروتئین می‌باشد. در نتیجه از این روش جهت تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب می‌توان استفاده نمود.

References:

1.Elleuche S, poggeler S. Intein, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 87: 479–89.
2.Pezza JA, Allen KN, Tolan DR. Intein-mediated purification of a recombinantly expressed peptide. Chem Commun 2004;21: 2412–13 .
3.Gogarten JP, Senejani AG, Zhaxybayeva O, et al. Inteins: structure, function, and evolution. Annu Rev Microbiol 2002; 56:263–87.
4.Chong S, Mersha FB, Comb DG, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. Gene 1997; 192: 277–81.
5.Chong S, Shao Y, Paulus H, et al. 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 Biol Chem 1996; 271: 22159 –68.
6.Anraku Y, Mizutani R, Satow Y. Protein splicing: Its discovery and structural insight into novel chemical mechanism. IUBMB Life 2005; 57(8): 563 –74.
7.Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 2003; 60:523–33.
8.Banki MR, Wood DW. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. Microb Cell Fact 2005; 4:32-37.
9.Wood DW, Wu W, Belfort G, et al. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. Nat Biotechnol 1999; 17: 889-92.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

10.Ashraf SS , Benson RE, Payne ES , et al. A novel multi-affinity tag system to produce high levels of soluble and biotinylated proteins in Escherichia coli. Protein Expr Purif 2004; 33: 238-45.
11.Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification and refolding of recombinant proteins. Protein Expr Purif 2006; 48: 1-13.
12.Glynou K , Ioannou PC, Christopoulos TK. On step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. Protein Expr Purif 2003; 27: 384-90.
13.Shimomura O. A Short Story of Aequorin. Biol Bull 1995; 189: 1-5.
14.Head JF, Inouye S, Teranishi K, et al. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. Nature 2000; 405: 372–6.
15.Inouye S. Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine. FEBS 2004; 577: 105–10.
16.Brini M. Calcium-sensitive photoproteins. Methods 2008; 46: 160–6.
17.Erikaku T, Zenno S, Inouye S. Bioluminescent immunoassay using a monomeric Fab'-photoprotein aequorin conjugate. Biochem Biophys Res Commun 1991; 174: 1331–6.
18.Deo SK, Lewis JC, Daunert S. Bioluminescence Detection of Proteolytic Bond Cleavage by Using Recombinant Aequorin. Anal Biochem 2000; 281: 87–94.
19.Rider TH, Petrovick MS, Nargi FE, et al. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. Science 2003; 301: 213-5.
20.Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. Trends Neurosci 1992; 15: 303-8.
21.Quincy Bioscience, Prevagen quality of life study, Data on file, 2009. http://quincybioscience.com/files/Aequorin-Protects-Adult-and-Aging-Hippocampal-CA1-Neurons-From-Ischemic-Cell-Death.pdf.
22.Zeinoddini M, Khajeh K, Hosseinkhani S, et al. Stabilisation of recombinant aequorin by polyols: activity, thermostability and limited proteolysis, Appl Biochem Biotechnol 2013; 170: 273-80.
23.Sharma SS, Chong S, Harcum SW. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in E.coli. J Biotechnol 2006; 125: 48-56.
24.Loughran ST, Walls D. Purification of poly-histidine-tagged proteins. Methods Mol Biol 2011; 681: 311-35.
25.Naumann TA, Savinov SN, Benkovic SJ. Engineering an affinity tag for genetically encoded cyclic peptides. Biotechnol Bioeng 2005; 92:820–30.
26.Tavassoli A, Benkovic SJ. Split-intein mediated circular ligation used in the synthesis of cyclic peptide libraries in E. coli. Nat Protoc 2007; 2: 1126–33.
27.Chong S, Mersha FB, Comb DG, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. Gene 1997; 192: 271–81.
28.Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. Curr Protoc Protein Sci 2010; 6: 6-11.
29.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: 1387–95.
30.Guan D, Ramirez M, Chen Z. Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP). Biotechnol Bioeng 2013; 110: 2471–81.
31.Elleuche S, Doring K, poggeler S. Minimization of a eukaryotic mini-intein. Biochem Biophys Res Commun 2008; 366: 239–43.
32.Derbyshire V, Wood DW, Wu W, et al. Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. Proc Natl Acad Sci 1997; 94:11466–71.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]

ISMJ 2015; 17(6): 1168-1175

Original Article

Cloning and expression of aequorin photoprotein using intein tag

E. Seyed Hosseini [1], M. Zeinoddini [1*], J. Fallah [1], AR. Saeedinia [1]

[1] Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, IRAN

(Received 4 Dec, 2013 Accepted 30 Jan, 2014)

Abstract

Background: Intein (INT), is the internal parts of the protein which can be separated from the immature protein during protein splicing process. This sequence requires no specific enzyme or cofactor for separation. This protein sequence and their characteristic of self-cleavage by thiol induction, temperature and pH changes is used for protein purification. The advantage of this method compared to the other protein purification methods is that it doesn't require any protease enzyme and protease removal steps that make this method important economically. In this study, aequorin photoprotein was hybridized with INT in molecular form and its expression was evaluated.

Materials and Methods : In this study, aequorin coding gene that was cloned in pET21-a in the previous studies, was cloned in pTYB21 vector containing INT tag by specific primers and restriction enzymes. Then the resulting pTY-aequarin was transformed to the ER_{2566} expression strain and cloning accuracy was confirmed by electrophoresis, western blotting and sequencing.

Results: The photoprotein aequorin was cloned into SapI/PstI restriction site of pTYB21 plasmid accurately and successfully. Aequorin- INT hybrid protein expression confirmed using traditional methods.

Conclusion: The photoprotein aequorin constract in fused with INT confirmed by molecular methods. Also rate of Aequorin- INT expression determined about %25 of cell total protein.

Keyword: Intein, Protein splicing, Cloning, Expression, Aequorin photoprotein

*Address for correspondence: Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, IRAN. E.mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-15]