نشانمند کردن پروتئین های نوترکیب جهت تخلیص سریع تر و ارزان تر

مریم عبدلی نسب*[۱] و مختار جلالی جواران[۲]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات و ۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

*نویسنده مسئول maryam_abdoly@yahoo.com

چکیده

با وجود امتیازات زیاد گیاهان تراریخت در تولید پروتئین نوترکیب، مشکل اساسی در تخلیص پروتئین های نوترکیب وجود دارد. روش های تخلیص بایست به گونه ای باشد که هزینه های تولید را کاهش داده و نیز کمیت، کیفیت، پایداری و فعالیت پروتئین تخلیص شده را حفظ کند. با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی تمایلی، که بر اساس میل جذبی خیلی بالا پروتئین نوترکیب به یک لیگاند ثابت شده روی ستون است، ضمن کاهش تعداد مراحل خالص سازی، خلوص پروتئین را نیز می توان افزایش داد. با تکنولوژی DNA نوترکیب، با الحاق یک دنباله با میل جذبی بالا به لیگاند خاص، به ناحیه N یا C انتهایی پروتئین نوترکیب، تحت عنوان نشانه یا برچسب (Tag)، می توان یک خصوصیت باندینگ خاص به درون هر پروتئین یا پپتید وارد و تخلیص پروتئین را آسان نمود. در این مطالعه برچسب‌های معمول که جهت خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند و خصوصیات مهم، مزایا، معایب و شرایط شستشو آنها جهت خالص‌سازی پروتئین معرفی می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین نوترکیب، تخلیص، کروماتوگرافی تمایلی، برچسب الحاق

مقدمه

در دنیای امروز، تقاضا برای تولید داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش است و چون معمولاً قیمت این داروها به فراوانی آنها را محدود می‌کند، لازم است سیستم‌هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند. رایج‌ترین و قدیمی‌ترین سیستم‌های بیان پروتئین نوترکیب فرمانتاسیون باکتریها (مانند E. Coli) یا سلول پستانداران (مانند سلول‌های تخمدان موش چینی) و مخمر می‌باشند. این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند. از بین سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب، سیستم بیان گیاهی بیش از سایر سیستم‌های تولید، امیدوار کننده به نظر می‌رسد و دارای مزایای بالقوه‌ای از جمله اقتصادی‌تر بودن سیستم‌های بیان گیاهی و ... می‌باشند. تعداد زیادی از پروتئین‌های انسانی از قبیل پروتئین‌های سرم خون، سیتوکنین‌ها، آنزیم‌های لیزوزومی، آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های دارای خواص دارویی را می‌توان در گیاهان تراریخته تولید کرد. پس از تولید در حجم وسیع پروتئین نوترکیب، مهمترین مرحله خلوص و دستیابی به پروتئین نوترکیب است. به خصوص پروتئین‌هایی که جهت کاربردهای دارویی و تشخیص به کار برده می‌شوند، بایستی به میزان بالایی خالص شوند. مهم ترین مرحله در تخلیص یک پروتئین، مرحله جداسازی پروتئین‌ها از سایر ناخالصی‌ها و آلاینده‌های موجود می‌باشد.

استفاده از روش‌های مختلف کروماتوگرافی جهت تخلیص پروتئین‌ها

کروماتوگرافی در یک تعریف کلی عبارت است از حرکت یک محلول از داخل یک بستر جامد جهت جداسازی ذرات موجود در محلول بر اساس ویژگیهای مختلف فیزیکی، شیمیایی یا زیستی. بر اساس خواصی نظیر جاذبه یونی، جاذبه هیدرونوبیک، جاذبه بیولوژیک و خاصیت نفوذپذیری چهار روش کروماتوگرافی را در بر می‌گیرد (Gray, 2002). **سیستم کروماتوگرافی مایع، سیستم کروماتوگرافی به روش تعویض یونی، کروماتوگرافی با جاذبه هیدرونوبیک (HIC)، کروماتوگرافی به روش فیلتراسیون ژل.**

کروماتوگرافی میل ترکیبی

کروماتوگرافی تمایلی پروتئین‌ها، بر اساس برهمکنش برگشت‌پذیر بین یک پروتئین و لیگاند اختصاصی که به ماتریکس کروماتوگرافی اتصال یافته است، می‌باشد. این تکنیک دارای قدرت انتخابی بالا، تفکیک بالا، معمولاً ظرفیت بالا برای پروتئین‌های هدف است. یک تخلیص تمایلی موفق نیازمند لیگاند اختصاصی زیستی است که به صورت کووالانسی به ماتریکس کروماتوگرافی اتصال پیدا کند. لیگاند اختصاص یافته باید تمایل اتصال اختصاصی خود به مولکول هدف را حفظ کند و پس از شستشوی غیر اتصال یافته به ستون، اتصال بین لیگاند و مولکول هدف باید به صورت برگشت‌پذیر باشد تا اجازه خروج مولکول هدف را در فرم فعال بدهد. به دلیل خصوصیات منحصر به فرد کروماتوگرافی تمایلی، به طور وسیع جهت خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده شده است اما اکثریت پروتئین‌ها فاقد لیگاند مناسب جهت چسبیدن به ماتریکس جامد هستند. یک راه برای غلبه بر این مشکل، استفاده از یک جزء الحاق یافته به پروتئین مورد نظر است که از لحاظ ژنتیکی توسط یک ژن کد شده و همراه با پروتئین مورد نظر بیان شود و به عنوان یک برچسب (tag) جهت شکار پروتئین توسط لیگاند چسبیده به ستون کروماتوگرافی استفاده شود. این استراتژی ابزار مفیدی جهت خالص کردن پروتئین‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی مختلف، در یک مسیر مشابه یا یکسان است. این سیستم خالص‌سازی پروتئین‌های الحاقی (fussion proteins) می‌تواند بر اساس انواع مختلفی از اثرات متقابل مانند اثرات متقابل پروتئین- پروتئین، اثرات متقابل آنزیم- سوبسترا، اثرات متقابل پروتئین- کربوهیدرات و اثرات متقابل پروتئین- فلز باشد.

خالص‌سازی پروتئین‌های مختلف با اتصال یک برچسب مناسب

برچسب‌های خالص‌سازی متداولی که استفاده می‌شوند را می‌توان به سه گروه تقسیم کرد: دومین‌های native، دومین‌های مهندسی شده و پپتیدها.

۱- پروتئین‌های native: از پروتئین‌های globular کوچک با خصوصیات بایندنیگ طبیعی آنها، مشتق شده‌اند. **و شامل** آنزیم‌ها با تمایل جذبی با سوبسترا یا inhibitor ثابت شده (B- گالاکتوزیداز، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST)) ، پروتئین‌ها یا دومین‌های قابل باند با کربوهیدرات (پروتئین قابل باند به مالتوز (MBP)) **و** دومین‌ها قابل باند به پلی پپتید(Staphylococcal protein A، SPG، **پروتئین‌های باند به استرپتویدین) می باشد.**

۲- دومین‌های مهندسی شده از لحاظ عملکرد: علاوه بر استفاده از دومین‌های طبیعی که به طور مستقیم به عنوان برچسب جهت خالص‌سازی پروتئین استفاده می‌شوند، این امکان وجود دارد که پروتئین‌هایی با خصوصیات

مطلوب را با متدهای مهندسی پروتئین کد کنیم و انواع مناسبی از برچسب را که مناسب با الگوی خالص‌سازی هستند ایجاد کنیم. **از جمله آنها** دومین‌های باردار شده (Z basic **و** Z acid)، دومین‌های His-Patched **و** دومین‌های Antiidiotypic **می باشد.**

۳- پپتیدها: برچسب های خالص سازی کوتاه هستند از مزایای آن صرف انرژی کمتر سلول جهت تولید محصول ژن، حذف راحت تر برچسب **و** آسان تر بودن پروسه کلونینگ آن می باشد. از جمله این برچسب ها **پپتیدهای آنتی ژن** (FLAG)**، پپتیدهای بایندینگ با پروتئین و پپتیدهای استرپتویدین- بایندینگ، پپتیدهای باردار شده و پپتیدهای باند با فلز می باشد.**

انتخاب ماتریکس

از مهمترین موضوعات selectivity است. با کار در مقیاس کوچک تر، قابلیت استفاده مجدد اهمیت زیادی دارد. اما در مقیاس صنعتی و بزرگتر، هزینه بیشترین اهمیت را دارد چون هزینه بایستی قیمت خالص شده پروتئین را پوشش دهد.

حذف برچسب پس از خالص سازی

حذف برچسب با متدهای آنزیمی یا شیمیایی امکانپذیر است. هیدرولیز شیمیایی اغلب شرایط سخت و خشن نیاز دارد و اغلب پروتئین را دناتوره میکند. همچنین نسبتا غیر اختصاصی عمل کرده و منجر به برش ناخواسته درون پروتئین هدف می شود. معمولا ترجیح داده می شود از پروتئولیز آنزیمی استفاده شود.

منابع:

1- Grashuad T., and S. Hober.2005. Protein engineering strategies for selective protein purification.Chem. Eng. Technol. No.11 p: 28

2- Zhang C, Robert T. Love, Joseph M. Jilka and Charles E. Glatz. 2008. Genetic Engineering Strategies for Purification of Recombinant Proteins from Canola by Anion Exchange Chromatography: An Example of β-Glucuronidase. Biotechnology Progress. Volume 17, Issue 1, pages 161–167.

3- Xiao-Dong Tong and Bo Xue Yan Sun. 2008. A Novel Magnetic Affinity Support for Protein Adsorption and Purification. Biotechnology Progress. Volume 17, Issue 1, pages 134–139.

Tagging of recombinant proteins for fast and low cost purification.

M. Abdoli Nasab* and M. Jalali Javaran
Tarbiat Modares University
***Email: maryam_abdoly@yahoo.com**

Abstract:

In order to protein purification, it is important to minimize the numbers of unit operation during purification procedure. Affinity chromatography based on couple of specific ligand to stationary phase, is the best chromatography technique for purification. In gene fusion strategy, the protein of interest is fused to purification tag. It has proven to be useful tools to purify. In this review, the most commonly used purification tags and their important characteristics are identified.

Key words: Recombinant protein, Purification, Affinity Chromatography, Tag Fusion