Pathobiology Research. 2018;21(1):7-13

Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Urate Oxidase Using Intein Sequence and Elastin-like Protein

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Azizi M.* *PhD*,
Enayati S.[1] *MSc*,
Salmasizadeh M.[1] *BSc*,
Zarreia N.[1] *PhD*,
Khalaj V.[1] *PhD*

How to cite this article
Azizi M, Enayati S, Salmasizadeh M, Zarreia N, Khalaj V. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Urate Oxidase Using Intein Sequence and Elastin-like Protein. Pathobiology Research. 2018;21(1):7-13.

*Medical Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[1]Medical Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Department of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Square, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551
Phone: +98 (21) 64112442
Fax: +98 (21) 66480780
m.azizi@pasteur.ac.ir

Article History
Received: October 29, 2017
Accepted: December 17, 2017
ePublished: April 10, 2018

ABSTRACT

Aims Expression and purification of recombinant Urate oxidase as well as other pharmaceutical proteins are a costly process. The use of non-chromatographic methods in the purification process can reduce production costs. So, the aim of this study was cloning, expression, and purification of recombinant urate oxidase, using intein sequence and elastin-like protein (ELP).
Materials & Methods In the present experimental research, the synthetic urate oxidase gene was cloned in downstream of ELP–Intein in an expression plasmid. After cultivating bacteria containing urate oxidase expression plasmid, the soluble fraction of cell lysate was separated from insoluble portion, using centrifugation. The recombinant urate oxidase was precipitated by adding salt and incubation at 37°C. The resulting precipitant was resuspended in cleavage buffer and the urate oxidase was separated from ELP through Intein moiety. Adding salt for the second time and incubation at 37°C resulted in separation of urate oxidase from fusion partner. After expressing and purifying the urate oxidase, purity and biological activity of recombinant urate oxidase were compared to standard drug.
Findings The recombinant urate oxidase was expressed and purified using ELP and Intein tags as fusions partners. The rescombinant enzyme showed a purity of %90 equal to 1.89 $mg.ml^{-1}$ based on protein concentration and 1.64 $mg.ml^{-1}$ based on activity.
Conclusion Using Intein sequence and Elastin-like protein, together with the Urate Oxidase enzyme helps to express and purify the enzyme without need for a chromatographic method.

Keywords Urate Oxidase; Purification; Intein; Elastin

CITATION LINKS

[1] A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis [2] Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: Results of a compassionate-use trial [3] Letter: Urate-oxidase treatment for hyperuricaemia. Lancet [4] High-level production of a peroxisomal enzyme: Aspergillus flavus uricase accumulates intracellularly and is active in Saccharomyces cerevisiae [5] Urate oxidase purification by salting-in crystallization: Towards an alternative to chromatography [6] Uricase production by a recombinant Hansenula polymorpha strain harboring Candida utilis uricase gene [7] High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillus flavus urate oxidase in Escherichia coli [8] Cloning, purification, and partial characterization of Bacillus subtilis urate oxidase expressed in Escherichia coli [9] Treating gout with pegloticase, a PEGylated urate oxidase, provides insight into the importance of uric acid as an antioxidant in vivo [10] Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of the GRAAL1 (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Trial on Rasburicase Activity in Adult Lymphoma) study [11] An improved nonchromatographic method for the purification of recombinant proteins using elastin-like polypeptide-tagged proteases [12] Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags [13] Cloning and expression of Aspergillus flavus urate oxidase in Pichia pastoris [14] Molecular cloning: A laboratory manual [15] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [16] Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association [17] Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution [18] Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density E. coli fermentation [19] Purification of microbially expressed recombinant proteins via a dual ELP split intein system [20] Affinity purification of proteins in tag-free form: Split intein-mediated ultrarapid purification (SIRP) [21] Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه الاستین

محمد عزیزی* PhD
بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
سمیه عنایتی MSc
بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
مریم سلماسی‌زاده BSc
بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نجمه زارعی PhD
بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
وحید خلج PhD
بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب همانند سایر پروتئین‌های دارویی مستلزم صرف هزینه‌های زیادی است. استفاده از روش‌های غیرکروماتوگرافی در فرآیند خالص‌سازی می‌تواند سبب کاهش هزینه‌های تولید شود. بنابراین، هدف پژوهش حاضر، همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، ژن صناعی اورات‌اکسیداز در پایین‌دست توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین در پلاسمید بیانی قرار داده شد. بعد از کشت باکتری حاوی پلاسمید بیان‌کننده اورات‌اکسیداز، سلول‌ها لیز و محتوی پروتئین محلول از غیرمحلول به‌وسیله سانتریفوژ جدا شد. با افزودن نمک به بخش محلول حاوی اورات‌اکسیداز و در دمای ۳۷°C، آنزیم مورد نظر رسوب داده شد. با انحلال رسوب در بافر خاص برش و به‌واسطه حضور توالی اینتئین، اورات‌اکسیداز تولیدشده از پروتئین شبه‌الاستین جدا شد. با افزودن مجدد نمک در دمای ۳۷°C پروتئین شبه‌الاستین رسوب و اورات‌اکسیداز در محلول باقی ماند. پس از بیان و خالص‌سازی اورات اکسیداز، میزان خلوص و فعالیت زیستی آن مورد ارزیابی قرار گرفت و با داروی استاندارد مقایسه شد.
یافته‌ها: آنزیم اورات‌اکسیداز نوترکیب به‌صورت فیوژن با توالی کدکننده اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بیان و خالص شد. میزان خلوص ۹۰% در این روش حاصل شد که معادل ۱/۸۹میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین بود. میزان مذکور معادل ۱/۶۴میلی‌گرم براساس فعالیت آنزیمی بود.
نتیجه‌گیری: استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین به‌صورت همراه با آنزیم اورات‌اکسیداز به بیان و خالص‌سازی این آنزیم بدون نیاز به روش کرماتوگرافی کمک می‌کند.
کلیدواژه‌ها: اورات‌اکسیداز، خالص‌سازی، اینتئین، الاستین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۰۹/۲۶
*نویسنده مسئول: m.azizi@pasteur.ac.ir

مقدمه
آنزیم اورات‌اکسیداز در بسیاری از موجودات و پستانداران به‌صورت طبیعی تولید می‌شود و تبدیل اسیداوریک به آلانتوئین را کاتالیز می‌نماید. شکل دارویی این آنزیم، راسبوریکاز است که به شکل نوترکیب تولید شده است. داروی راسبوریکاز یا اورات‌اکسیداز نوترکیب با نام تجاری الیتک (Elitek)، یک عامل موثر در کاهش غلظت سرمی اسیداوریک در بیماران مبتلا به افزایش اسیداوریک خون است. این داروی نوترکیب در کودکان مبتلا به لوسمی که در پاسخ به عوامل شیمی‌درمانی دچار غلظت‌های بالای اسیداوریک می‌شوند بر دیگر داروی کاهنده اسیداوریک، یعنی آلوپورینول ارجحیت دارد[1, 2].

این آنزیم اولین‌بار از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) جدا شد و در ایتالیا و فرانسه با نام تجاری یوریکوزایم به‌منظور کاهش موقتی و سریع اسیداوریک خون در بیماران مبتلا به هیپراوریسمی به کار گرفته شد. این دارو مشکلات کمتری از لحاظ ایمنی‌زایی و حلالیت در مقایسه با انواع باکتریایی داشت[3]. در تحقیقات بعدی ژن اورات‌اکسیداز از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) همسانه‌سازی شد و بیان آن تولید پروتئینی با حلالیت مناسب‌تر و ایمنی‌زایی کمتری نسبت به سایر روش‌های تولیدی نشان داد[4]. فرم دارویی راسبوریکاز نوترکیب در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تولید می‌شود و در واقع روش اصلی تولید این دارو مبتنی بر بیان در مخمر است[5]. از انواع سیستم باکتریایی مانند *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*) و مخمری مانند *هانسنولا پلی‌مورفا* (*Hansenula polymorpha*) برای بیان این پروتئین استفاده شده است[6-8]. برای افزایش کارآیی این آنزیم در بدن، فرم‌های متفاوتی از قبیل پگیله‌شده و شکل کوچک‌شده تهیه و بیان آنها در میزبان‌های مختلف بررسی شده است[9].

اگرچه ژن مربوط به تولید این آنزیم در انسان وجود دارد، اما ظاهراً به‌دلیل یک جهش نامفهوم در ناحیه رمزکننده، تولید آن در انسان صورت نمی‌پذیرد. گمان می‌رود این واقعه تکاملی به‌دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی اسیداوریک رخ داده باشد[10]. اورات‌اکسیداز یک آنزیم هوموتترامر با وزن ۱۳۵کیلودالتون است که دارای ۴ جایگاه فعال در حد فاصل ۴ زیرواحد یکسان خویش است (هر جایگاه فعال ۳۴کیلودالتون)[10]. اورات‌اکسیداز قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* از لحاظ عدم نیاز به هیچ گونه کوفاکتور ارگانیک یا اتم فلزی برای فعالیت خود، منحصربه‌فرد است. در ساختار این آنزیم ۲۴ آمینواسید حفظ‌شده وجود دارد که ۱۵ عدد از آنها در جایگاه فعال حضور دارند. این آنزیم علاوه بر کاربردهای درمانی در کیت‌های تشخیصی تعیین اسیداوریک سرم نیز به کار می‌رود.

توالی پروتئین شبه‌الاستین در سال‌های اخیر برای خالص‌سازی پروتئین‌های همراه مورد توجه قرار گرفته است. این پپتید متشکل از ۶۰ تا ۱۱۰ تکرار توالی VPGXG است که در آن X هر اسیدآمینه‌ای می‌تواند باشد. این توالی می‌تواند به‌صورت برگشت‌پذیر رسوب کند و با تغییر شرایط بافری به‌تناوب به شکل رسوب و محلول ظاهر شود[11]. توالی دیگری که در چند سال اخیر مورد استفاده قرار گرفته، توالی اینتئین است که دارای قابلیت برش خودبه‌خودی در دمای محیط و pH نزدیک به خنثی است[12].

در مطالعات قبلی توالی ژن کدکننده این آنزیم با طول ۹۶۳ جفت باز از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* گرفته و به‌صورت مصنوعی ساخته شده است. پس از همسانه‌سازی این ژن در مخمر *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*)، پروتئین مذکور با موفقیت در این میزبان بیان شده است[13]. با پیشرفت‌های اخیری که در طراحی ناقل‌های بیانی و سویه‌های جدید پروکاریوتی اتفاق افتاده است، قابلیت پردازش و شکل‌گیری صحیح پروتئین هدف مشابه با آنچه که در سیستم‌های یوکاریوتی وجود دارد، امکان‌پذیر شده است. لذا به‌دلیل سهولت تولید پروتئین در میزبان پروکاریوتی (بیان بالا، افزایش حجم تولید ساده، محیط کشت ارزان و مقرون‌به‌صرفه‌بودن فرآیند) باکتری *اشریشیاکلی* مورد توجه قرار گرفت.

در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی امکان بیان اورات‌اکسیداز در باکتری *اشریشیاکلی* و قابلیت پردازش و تاخوردگی مناسب در سیستم پروکاریوتی، ژن مورد نظر در پایین‌دست توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین قرار گرفت و بیان آن در سیستم بیانی *اشریشیاکلی* با روش‌های مرسوم القا شد. در نهایت، پروتئین

نوترکیب حاصل به‌واسطه حضور توالی‌های فوق، تخلیص و فعالیت زیستی آن مورد سنجش قرار گرفت. بنابراین هدف پژوهش حاضر همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود.

مواد و روش‌ها

ساخت ناقل بیانی: در پژوهش تجربی حاضر، قطعه ژن مربوط به اورات‌اکسیداز (شرکت Gene Ray؛ چین) در مطالعات قبلی این گروه، سنتز شده و موجود بود. در مرحله بعد این ژن به‌وسیله آغازگرهای زیر تکثیر شد:

آغازگر رفت: TGTACACAACTCTGCCGTCAAAG

آغازگر برگشت: CCATGGTTAATGGTGATGATGGTGGTG

طراحی آغازگرها به‌صورتی انجام شد که در ابتدای ژن جایگاه برش آنزیم *Bsr*G1 و در انتهای آن جایگاه برش آنزیم *Nco*I قرار گیرد. به این صورت امکان همسانه‌سازی در ناقل هدف که حاوی ژن‌های اینتئین و ژن پروتئین شبه‌الاستین بود فراهم شد. پس از تکثیر ژن با استفاده از این آغازگرها محصول PCR در ناقل T/A (pGEM®-T Easy Vector، Promega) همسانه‌سازی شد. برای انتقال پلاسمید، سلول‌های مستعد به‌روش کلسیم‌کلراید تهیه شد[14]. در این مرحله از باکتری *اشریشیاکلی* سویه DH5α به‌عنوان میزبان استفاده شد. با استفاده از روش استاندارد تراریختی یا شوک حرارتی، انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان صورت گرفت[14]. برای انتخاب کلون‌های نوترکیب از کشت روی محیط جامد و جداکردن تک‌کلونی استفاده شد. بعد از اطمینان از قرارگرفتن محصول PCR در ناقل واسط، ژن اورات‌اکسیداز مجدداً با آنزیم‌های برش‌گر جدا و در ناقل بیانی همسانه‌سازی شد. برای این منظور و برای شکل‌گیری صحیح چهارچوب خواندن، تنها امکان استفاده از آنزیم *Bsr*G1 وجود داشت. از طرفی توالی ژن اورات‌اکسیداز صناعی (Synthetic) حاوی یک جایگاه *Bsr*G1 است که این ژن را به دو قطعه تبدیل می‌کند. برای جلوگیری از خردشدن کامل ژن، از طریق برش نسبی با آنزیم‌های *Bsr*G1/*Nco*I ژن مربوطه از ناقل واسط جدا شد. در این نحوه برش با هضم آنزیمی و کنترل محصول برش در زمان‌های مختلف، قطعه کامل مورد نظر به دست آمد. قطعه مذکور با استفاده از کیت‌های خالص‌سازی تجاری از ژل استخراج و در جایگاه *Bsr*G1/*Nco*I ناقل هدف pET-ELP-I-CAT همسانه‌سازی شد[12]. این ناقل از سری ناقل‌های pET بود که سایر اجزا در آن از قبل همسانه‌سازی شده بود. پس از قرارگرفتن ژن در ناقل بیانی با هضم آنزیمی و انجام PCR روی ژن مورد نظر حضور آن بررسی شد. پس از تایید حضور ژن، پلاسمید در مقیاس انبوه استخراج شد.

تراریخت و غربالگری کلون‌های بیان‌کننده: از باکتری *اشریشیاکلی* سویه BL21 DE3 برای بیان استفاده شد. سلول‌های مستعد برای انتقال پلاسمید به‌روش کلسیم‌کلراید تهیه شدند و از طریق شوک حرارتی انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان انجام شد[14]. برای انتخاب کلون‌های نوترکیب کشت روی محیط جامد و جداسازی تک‌کلونی انجام شد. به‌منظور یافتن کلون‌هایی با بیان بیشتر چندین کلونی نوترکیب در پلیت کشت به‌صورت جداگانه رشد داده شدند. برای بررسی میزان بیان، هر یک از این کلونی‌ها در شرایط القا، کشت داده شدند و میزان بیان هر کلونی به‌صورت جدا توسط الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید مورد بررسی قرار گرفت. سپس سلولی که مقدار تولید بالاتری را در الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید و وسترن‌بلات نشان داد، انتخاب شد.

کشت باکتری و بیان پروتئین: برای بیان و تخلیص آنزیم اورات‌اکسیداز، سلول‌ها در حجم یک‌لیتر کشت و در شرایط القا قرار گرفتند. ابتدا یک تک‌کلونی در ظرف حاوی ۲۵میلی‌لیتر محیط کشت و ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در دمای ۳۷°C کشت داده شد. بعد از ۱۶ ساعت، این کشت ۲۵میلی‌لیتری به ظرف جدید حاوی یک‌لیتر محیط کشت تازه منتقل شد و برای مدت ۶ ساعت در همان دما قرار گرفت. پس از رسیدن تراکم سلول به OD_{600}~۰/۶، مقدار یک‌میلی‌لیتر از محلول ایزوپروپیل β-D-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت یک‌مولار افزوده شد تا غلظت نهایی به یک‌میلی‌مولار برسد و به‌صورت شبانه در شرایط القا کشت داده شد.

تخلیص پروتئین: توده زیستی باکتریایی حاصل از یک‌لیتر محیط کشت با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و برای مدت ۱۰دقیقه جمع‌آوری شد. سلول‌ها در ۵۰میلی‌لیتر بافر مخصوص لیز سلولی (Tris-HCl ۱۰میلی‌مولار، pH برابر با ۸/۵، EDTA ۲میلی‌مولار، لیزوزیم ۰/۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) سوسپانسیون شد. سوسپانسیون حاصل برای مدت ۴۵دقیقه روی یخ نگهداری شد و پس از این زمان از دستگاه هموژنایزر فشاربالا برای لیز سلولی استفاده شد. پس از ۳-۲ مرحله عبوردادن از دستگاه هموژنایزر از لیز سلولی اطمینان حاصل شد. بخش محلول از باقی‌مانده نامحلول لیز سلولی به‌وسیله سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵دقیقه جدا شد.

به مقدار ۴۰میلی‌لیتر از بخش محلول حاصل از لیز سلولی، مقدار ۱۰میلی‌لیتر نمک سدیم‌کلراید ۳مولار افزوده شد و از طریق ورتکس نمونه‌ها مخلوط شد. محلول حاصل در شرایط دمای ۳۰°C برای مدت ۱۵دقیقه همراه با هم‌زدن آرام در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. بعد از این مدت تیوب‌ها برای مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل از محلول بالایی جدا شد. در این مرحله، رسوب نگهداری و محلول بالایی بعد از برداشت نمونه برای آنالیز دور ریخته شد. رسوب به‌دست‌آمده در یک‌میلی‌لیتر از بافر فسفات‌سالین (PBS) به‌علاوه ۴۰میلی‌مول تریس (بیس-تریس، pH برابر با ۶/۲) و ۲میلی‌مول EDTA حل شد.

نمونه در طول شب در دمای ۲۲°C-۱۸ نگهداری شد. بعد از کامل‌شدن فرآیند برش، یک‌میلی‌لیتر از نمک سدیم‌کلراید ۳مولار افزوده شد و پس از مخلوط‌شدن به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای ۳۰°C قرار گرفت. بعد از این مدت نمونه برای مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق در سرعت دوران ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سوپ بالایی که حاوی پروتئین خالص‌شده بود، به تیوب جدید منتقل شد. برای ارزیابی خلوص پروتئین‌ها در هر مرحله از الکتوفورز در ژل پلی‌آکریلامید استفاده شد. در مواردی که نیاز به خلوص بیشتری بود این فرآیند برای یک مرتبه دیگر از ابتدا اجرا شد.

ارزیابی فرآیند تخلیص به‌وسیله الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید و وسترن‌بلات: برای بررسی فرآیندهای مختلف بیان و نیز خلوص پروتئین به‌دست‌آمده، نمونه‌های پروتئینی روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰% تحت شرایط احیاکنندگی (با اضافه‌کردن مرکاپتواتانول) الکتروفورز شدند. برای رنگ‌آمیزی باندهای پروتئین از رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو و در مواردی که نیاز به حساسیت بیشتری بود، از

رنگ‌آمیزی نقره به‌روش استاندارد استفاده شد. در مراحلی که نیاز به شناسایی و تایید پروتئین هدف بود، از آزمون وسترن‌بلات با به‌کارگیری آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی تولیدشده در مطالعه *فاضل* و همکاران[13] استفاده شد. به این ترتیب که بعد از الکتروفورز پروتئین‌ها روی ژل پلی‌آکریلامید، عمل انتقال به کاغذ نیتروسلولز انجام شد. کاغذ نیتروسلولز به‌مدت یک ساعت در بافر PBS حاوی ۱% شیر بدون چربی قرار گرفت. بعد از این مرحله کاغذ نیتروسلولز به‌وسیله بافر PBS شست‌وشو و به‌مدت یک ساعت در بافر PBS حاوی آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی با غلظت ۱:۵۰۰ و در دمای اتاق قرار گرفت. عمل شست‌وشو با بافر PBS حاوی ۰/۰۵% حجمی/حجمی توئین ۲۰ برای سه مرتبه تکرار شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه ضدایمنوگلوبولین خرگوش که با پراکسیداز کونژوگه شده بود (رازی بیوتک؛ ایران) با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBS استفاده شد. کاغذ نیتروسلولز در این بافر به‌مدت یک ساعت و در دمای اتاق تیمار شد. از محلول حاوی ۰/۰۵% دی‌آمینوبنزیدین و ۰/۰۱۵% آب‌اکسیژنه در بافر PBS، برای ظهور باند پروتئین در کاغذ نیتروسلولز استفاده شد. از سلول‌های میزبان اولیه بدون وجود ناقل بیانی به‌عنوان کنترل‌منفی برای این مرحله استفاده شد.

تعیین غلظت نمونه پروتئین خالص‌شده به‌روش برادفورد: به‌منظور تعیین مقدار پروتئین تام یا خالص‌شده از روش برادفورد استفاده شد[15]. در هر آزمایش تعیین مقدار پروتئین، از آب‌مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد. برای انجام آزمون برادفورد، ۲۰میکرولیتر از نمونه پروتئینی به یک تیوب افزوده شده و سپس مقدار یک‌میلی‌لیتر محلول کوماسی‌بلو G-250 به آن اضافه شد. سپس جذب نمونه در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵نانومتر تعیین شد. اعداد جذب خوانده‌شده در منحنی استاندارد قرار گرفت و غلظت پروتئین خالص‌شده به دست آمد.

تعیین فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم اورات‌اکسیداز با استفاده از روش ذکرشده در مطالعات قبلی سنجیده شد. به‌طور خلاصه، آنزیم اورات‌اکسیداز، اسیداوریک را به آلانتوئین و آب‌اکسیژنه تبدیل می‌نماید. آب‌اکسیژنه به‌همراه ۴-آمینوآنتی‌پیرین به‌عنوان سوبسترای پراکسیداز منجر به ایجاد رنگ در محلول شده و سپس واکنش با افزودن اسیدپرکلریک ($HClO_4$ ۰/۶میلی‌مولار) متوقف می‌شود. رنگ تولیدشده با میزان اورات‌اکسیداز رابطه مستقیم دارد. از طریق قراردادن اعداد در منحنی استاندارد رسم‌شده از آنزیم شاهد (داروی موجود در بازار) فعالیت آنزیم تولیدی سنجیده شد.

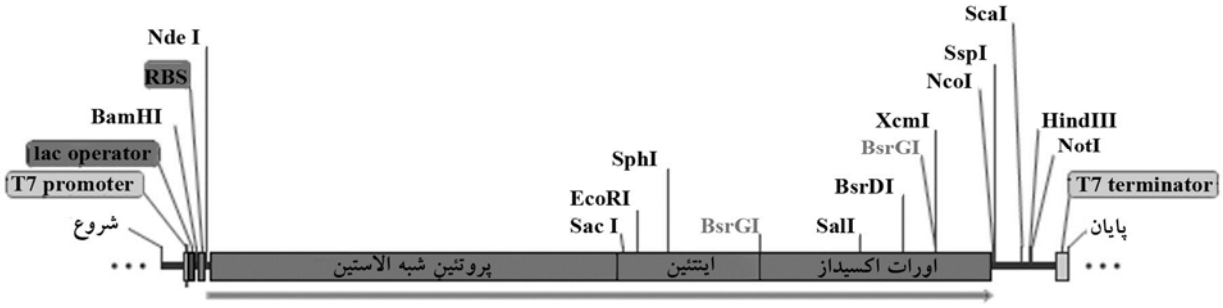
به‌منظور استانداردنمودن روش مورد استفاده و نیز به‌حداقل‌رساندن خطای آزمون و تاثیر فاکتورهای بیرونی، تمام شرایط برای نمونه کنترل‌مثبت و نمونه آزمودنی یکسان فراهم شد. روش مورد استفاده به قرار زیر بود.

مقدار ۴۰میکرولیتر از نمونه خالص‌شده نهایی با غلظت ۱/۸۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (براساس روش برادفورد) برای بررسی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. برای رسم منحنی استاندارد از داروی موجود در بازار به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. مقادیر متفاوت صفر، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲میکرومول از آنزیم استاندارد نیز در چاهک‌های دیگر پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. حجم نهایی تا حجم ۴۰میکرولیتر با فسفات بافر تکمیل شد تا شرایط یکسان برای نمونه آزمون و استاندارد فراهم شود. مقدار ۱۰میکرولیتر از محلول واکنش که حاوی ۶میلی‌مول اسیداوریک در بافر بورات بود، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. ترکیب بافر بورات شامل بوریک‌اسید ۱۰۰میلی‌مولار، سدیم‌کلراید ۷۵میلی‌مولار، سدیم‌تترابورات ۲۰میلی‌مولار و pH آن برابر ۸/۶ بود. سپس مقدار ۵میکرولیتر از محلول حاوی ۱۵ واحد پراکسیداز در میلی‌لیتر در بافر فسفات افزوده شد. در ادامه مقدار ۱۵میکرولیتر از محلول حاوی ۳۰میلی‌مول ۴- آمینوآنتی‌پیرین و ۱% فنل افزوده شد. واکنش در دمای ۳۷°C برای مدت ۳۰دقیقه نگهداری و سپس جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۰۵نانومتر خوانده شد. غلظت آنزیم استاندارد ۰/۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر معادل ۲/۷ واحد در میلی‌لیتر بود. با رسم منحنی استاندارد براساس جذب حاصل از غلظت‌های مختلف استاندارد، فعالیت آنزیمی پروتئین خالص‌شده با معادله خط مربوطه به شرح زیر محاسبه شد:

$Y=۰/۰۰۸۵x+۰/۰۱۵۹$

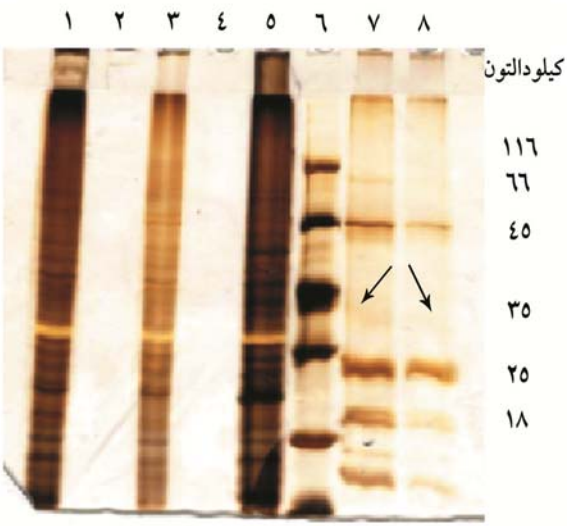
یافته‌ها

توالی کدکننده آنزیم اورات‌اکسیداز در پایین‌دست توالی کدکننده پروتئین شبه‌الاستین و توالی اینتئین در پلاسمیدی با پایه pET قرار گرفت (شکل ۱). بعد از انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *اشریشیاکلی*، سویه BL21-DE3 کلونی‌های حاصل از نظر میزان بیان، ارزیابی و بر مبنای مقایسه میزان بیان در ژل پلی‌آکریلامید چندکلونی مجزا انتخاب و با شماره‌گذاری در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد. این سلول باکتریایی برای بیان پروتئین اورات‌اکسیداز و خالص‌سازی استفاده شد.



شکل ۱) تصویر شماتیک از ساختار ژن کدکننده آنزیم اورات‌اکسیداز در پایین‌دست پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین

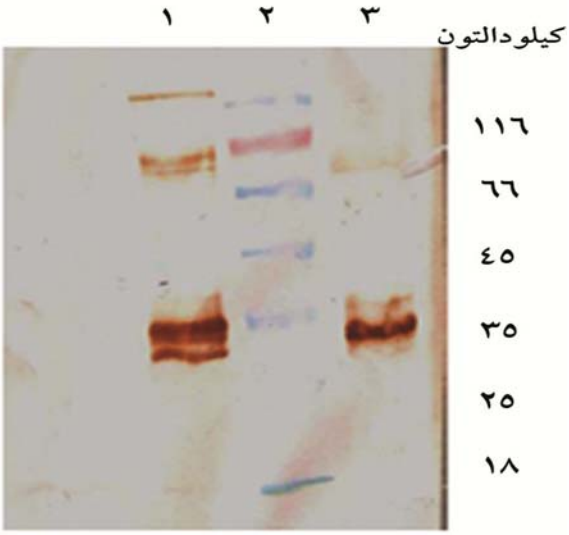
سلول باکتریایی به‌دست‌آمده از یک‌لیتر محیط کشت پس از بیان پروتئین جمع‌آوری و توزین شد. این مقادیر معادل ۲گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود. بعد از لیز باکتری‌ها، پروتئین تام سلولی در ژل پلی‌آکریلامید ۱۰% الکتروفورز شد؛ پس از رنگ‌آمیزی باند پروتئین‌ها از طریق اندازه‌گیری وزن توده سلولی و اندازه‌گیری مقدار پروتئین، مقادیر یکسان از پروتئین تام برای الکتروفورز استفاده شد. در نهایت، پروتئین هدف در حدود ۳۵کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲) تصویر الکتروفورز پروتئین در ژل آکریلامید ۱۰% بعد از رنگ‌آمیزی نیترات نقره

چاهک ۱: بخش نامحلول از لیز باکتری پس از سانتریفوژ؛ چاهک ۲: چاهک خالی؛ چاهک ۳: بخش محلول از لیز باکتری پس از سانتریفوژ؛ چاهک ۴: چاهک خالی؛ چاهک ۵: نمونه لیز سلولی تام شامل بخش محلول و نامحلول؛ چاهک ۶: شاخص وزن مولکولی پروتئین؛ چاهک ۷: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از یک مرحله خالص‌سازی؛ چاهک ۸: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از دوبار تکرار فرآیند خالص‌سازی

بعد از یک مرحله انجام مراحل خالص‌سازی و برش به‌وسیله توالی اینتئین تا حدود ۸۰% خلوص حاصل شد. در ادامه با انجام مجدد فرآیند، این درجه خلوص به بیش از ۹۰% افزایش یافت (شکل ۲). در هر آزمون باند پروتئین نوترکیب بیان‌شده حدود ۳۵کیلودالتون مشاهده شد و به‌وسیله وسترن‌بلات تایید شد (شکل ۳).



شکل ۳) تصویر وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی

نمونه ۱: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از یک مرحله خالص‌سازی؛ نمونه ۲: شاخص وزن مولکولی پروتئین؛ نمونه ۳: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از دوبار تکرار فرآیند خالص‌سازی

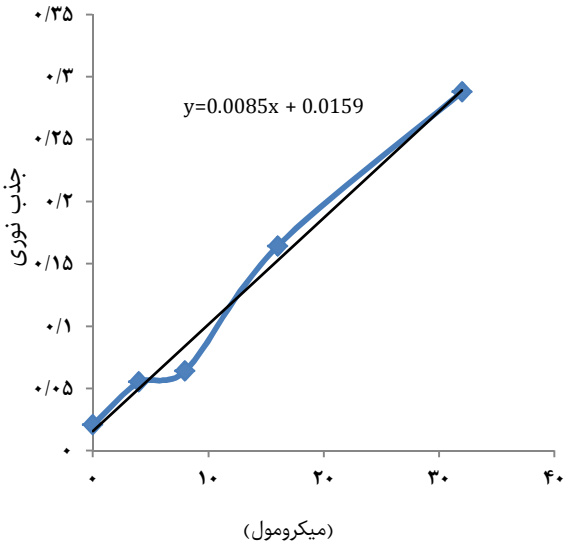
براساس روش برادفورد و منحنی استاندارد رسم‌شده، مقدار پروتئین خالص‌شده معادل ۱/۸۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به حجم نمونه موجود و مقدار پروتئین تام اولیه، این مقدار معادل ۳/۷۸میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت مایع بود.

میزان جذب اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵نانومتر از غلظت‌های مختلف نمونه استاندارد آنزیم اورات‌اکسیداز تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱) میزان جذب اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵نانومتر از غلظت‌های مختلف نمونه استاندارد آنزیم اورات‌اکسیداز

غلظت استاندارد (میکرومول)	جذب در ۵۰۵نانومتر
۰	۰/۰۲۱
۴	۰/۰۵۵
۸	۰/۰۶۴
۱۶	۰/۱۶۴
۳۲	۰/۲۸۸

منحنی استاندارد مربوطه براساس اعداد جذب متناظر هر غلظت رسم شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) منحنی استاندارد حاصل از واکنش غلظت‌های مختلف آنزیم اورات‌اکسیداز در واکنش آنزیمی به‌روش رنگ‌سنجی

مطابق با معادله خط حاصل از منحنی استاندارد، فعالیت آنزیمی پروتئین خالص‌شده در مقایسه با نمونه استاندارد محاسبه شد. جذب یک نمونه از پروتئین خالص‌شده برابر با ۰/۴۲۴ بود که پس از قرارگرفتن در معادله خط غلظتی معادل ۴۸/۰۱میکرومول به دست آمد. بر این اساس در نمونه خالص‌شده با حجم یک‌میلی‌لیتر معادل ۴۸میکرومول پروتئین وجود داشت که این مقدار با توجه به وزن مولکولی پروتئین هدف که برابر با ۳۵کیلودالتون بود، معادل ۱/۶۴میلی‌گرم پروتئین است.

بحث

هدف پژوهش حاضر همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود. فرآیند پایین‌دستی در صنعت دارویی زیستی شامل مراحل مختلف از جمع‌آوری سلول از فرمانتور تا دستیابی به پروتئین خالص نهایی یا ماده اولیه دارویی برای فرمولاسیون نهایی است. این بخش از فرآیند تولید در صنعت معمولاً بخش عمده هزینه‌های تولید را در بر می‌گیرد. به همین دلیل کاهش هزینه‌های فرآیند پایین‌دستی یکی از اهداف تحقیقاتی شرکت‌های دارویی برای برنامه‌های تحقیق و توسعه است. در این میان قسمت عمده و هزینه‌بر از فرآیند پایین‌دستی، فرآیند خالص‌سازی یا تخلیص است.

در بیش از ۹۵% از موارد در مراحل تخلیص و تولید داروهای زیستی از یک یا چند مرحله خالص‌سازی به‌روش کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود. این موضوع سبب شده است که فرآیندهای خالص‌سازی غیرکروماتوگرافی مورد توجه قرار گیرد. طیف وسیعی از این روش‌ها شامل استفاده از روش‌های رسوب با نمک رسوب، به‌وسیله ترکیبات شیمیایی، استفاده از ترکیبات دوفازی مانند پلی‌اتیلن گلایکول و غیره مورد استفاده قرار گرفته است.

یکی از روش‌های جدید، استفاده از توالی پروتئین است که در طبیعت یافت می‌شود و در غلظت‌های مختلف نمک یا اسیدیته مختلف، رفتار متفاوتی به‌صورت محلول یا غیرمحلول از خود نشان می‌دهد. استفاده از این توالی به‌صورت فیوژن با پروتئین هدف می‌تواند به‌منظور خالص‌سازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد[16].

فونگ و همکاران، در بررسی اثرات pH و دما روی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین در خالص‌سازی پروتئین به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از نمک سدیم‌کلراید می‌تواند اثرات بهتری نسبت به استفاده از سایر ترکیبات برای رسوب پروتئین شبه‌الاستین داشته باشد. همچنین استفاده از نمک نه‌تنها نتایج بهتری نسبت به عوامل اسیدی و بازی نشان داد، بلکه از نظر اقتصادی نیز نسبت به سایر روش‌ها مقرون به‌صرفه بود[17]. همچنین *فونگ* و همکاران به بررسی میزان بازده استفاده از پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین برای خالص‌سازی بتا-گالاکتوزیداز در روش‌های مختلف کشت باکتری پرداخته‌اند. در این تحقیق میزان بازده خالص‌سازی در استفاده از فلاسک کشت بین ۵۷ تا ۱۰۹میلی‌گرم در لیتر بیان شده است. اگر چه در این تحقیق انواع سویه‌های مختلف باکتری و محیط‌های کشت متفاوت مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما میزان بازده بیان در روش فلاسک نسبت به کشت بچ در فرمانتور مقادیر بیشتری را نشان داده است. در ادامه زمانی که از روش کشت فد- بچ استفاده شده بود، میزان بازده و مقدار پروتئین خالص‌شده به ازای لیتر محیط کشت افزایش قابل توجهی داشته است[18]. یکی از دلایل این افزایش، میزان چگالی سلول پس از اتمام فرآیند تخمیر است که میزان توده زیستی افزایش قابل توجهی نسبت به‌روش فلاسک یا روش کشت بچ داشته است. نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر نشان داد که مقدار ۱/۶۸میلی‌گرم در میلی‌لیتر در انتهای فرآیند خالص‌سازی قابل دستیابی است. هر چند این مقدار کمتر از مقادیر ذکرشده در مقالات قبل بود، ولی بهینه‌سازی فرآیندهای کشت و القا و نیز بررسی شرایط مختلف محیطی قابل بررسی و ارزیابی بیشتر بود که پیش‌بینی می‌شود تاثیر زیادی بر بازده تخلیص داشته باشد.

یکی از معایبی که در مورد استفاده از توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین در فرآیند تخلیص پروتئین وجود دارد، برش زودهنگام این توالی در زمان بیان پروتئین و قبل از خالص‌سازی است. به‌منظور اصلاح این فرآیند از توالی اینتئین به‌صورت دو قطعه جداگانه در فرآیند بیان استفاده شد. این توالی در ادامه و در طول فرآیند خالص‌سازی ابتدا به مولکول کامل تبدیل و سپس از خاصیت برش مولکول اینتئین استفاده می‌شود[19, 20].

در مورد فرآورده‌های دارویی انسانی خصوصاً از نوع تزریقی هنوز لازم است مراحل مختلفی از انواع کرماتوگرافی ستونی مورد استفاده قرار گیرد، هر چند استفاده از روش‌های غیرکروماتوگرافی مانند روش‌های رسوب‌دهی به‌عنوان مراحل اولیه تخلیص قابل استفاده بوده و بخش عمده‌ای از ناخالصی‌ها با این روش‌ها قابل جداسازی است. استفاده از این نوع روش‌ها به‌صورت روتین در صنایع داروسازی مرسوم است که این روش اخیر نیز می‌تواند کاندید استفاده در صنایع به‌طور همزمان با سایر روش‌های رسوب‌دهی یا به‌صورت روش مستقل باشد.

همان‌طور که در مطالعات قبل مشخص شده است، پروتئین شبه‌الاستین قابلیت اتصال به پروتئین‌های هترولوگ و ایجاد خاصیت تغییر حلالیت در شرایط بافری مختلف را دارد[13]. در همین راستا ژن کدکننده اورات‌اکسیداز به‌صورت فیوژن با این پروتئین طراحی و بیان شد. به‌منظور سهولت در فرآیند خالص‌سازی در حد فاصل پروتئین هدف و توالی پروتئین شبه‌الاستین از توالی دیگری به نام اینتئین استفاده شد. توالی اینتئین نیز دارای خاصیت برش خودبه‌خودی است که در شرایط بافری مختلف و در حضور ترکیبات احیاکننده مانند مرکاپتواتانول، سبب ایجاد برش در توالی خاص از اسیدآمینه می‌شود. در گذشته نیز از توالی اینتئین همراه با توالی متصل‌شونده به کیتین برای بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز استفاده شده است[21]. لیکن این محققان از توالی متصل‌شونده به کیتین استفاده نموده‌اند که مستلزم به‌کارگیری ستون کرماتوگرافی جذبی بود. آنچه تحقیق حاضر را متفاوت از سایر مطالعات کرد به‌کارگیری توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین به‌طور همزمان برای حذف روش کروماتوگرافی از فرآیند تخلیص اورات‌اکسیداز است. به این ترتیب با طراحی این ساختار و بیان پروتئین اورات‌اکسیداز همراه با توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین از طرفی خالص‌سازی پروتئین هدف، تسریع شد و از طرفی حذف پروتئین همراه یا فیوژن که معمولاً خود از فرآیندهای وقت‌گیر و هزینه‌بر است با تغییر در بافر انجام شد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر، برش زودهنگام توالی اینتئین است که در زمان بیان پروتئین و قبل از خالص‌سازی اتفاق می‌افتد. در برخی از مقالات به‌منظور اصلاح این فرآیند از توالی اینتئین به‌صورت دو قطعه جداگانه استفاده شد. این قطعات بعد از بیان به یکدیگر متصل و پروتئین فعال حاصل می‌شود.

گرچه در عمل میزان خلوص نهایی ۸۰ تا ۹۰% به دست آمد، ولی نمی‌توان این درصد از خلوص را مناسب برای فرآورده دارویی در نظر گرفت. هر چند در بسیاری از فرآورده‌های غیردارویی یا دارای مصرف غیرانسانی و همچنین فرآورده‌های موضعی، این درصد از خلوص قابل قبول بوده و قابلیت استفاده به‌عنوان فرآورده را خواهد داشت. هر یک از این روش‌ها در نهایت برای استفاده در صنعت نیاز به بررسی امکان‌سنجی و اعتبارسنجی دارد که پیشنهاد می‌شود ابتدا در فرآیندهایی با مقیاس کم و در صنایع دارای ریسک کمتر مورد استفاده قرار گیرد. در صورت مناسب‌بودن از جنبه‌های صنعتی و اقتصادی، روش اخیر می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های جاری خالص‌سازی باشد و به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین به‌صورت همراه با آنزیم اورات آکسیداز به بیان و خالص‌سازی این آنزیم بدون نیاز به روش کرماتوگرافی کمک می‌کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مسئولان انستیتو پاستور به‌خاطر فراهم‌آوردن امکان اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از کارکنان بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تشکر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش بدون نیاز به تاییدیه اخلاقی به

تصویب شورای پژوهشی انستیتو پاستور رسیده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه منافع مالی و معنوی در خصوص نتایج این پروژه ندارند.

سهم نویسندگان: محمد عزیزی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰%)؛ سمیه عنایتی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ مریم سلماسی‌زاده (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ نجمه زارعی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ وحید خلج (نویسنده پنجم)، پژوهشگر اصلی (۲۰%).

منابع مالی: این پروژه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و در قالب طرح مصوب به شماره ۹۰۹ اجرا شد.

منابع

1- Goldman SC, Holcenberg JS, Finklestein JZ, Hutchinson R, Kreissman S, Johnson FL, et al. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis. Blood. 2001;97(10):2998-3003.

2- Pui CH, Jeha S, Irwin D, Camitta B. Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: Results of a compassionate-use trial. Leukemia. 2001;15(10):1505-9.

3- FitzGerald O, Fitzpatrick DA, McGeeney KF. Letter: Urate-oxidase treatment for hyperuricaemia. Lancet. 1975;1(7905):525.

4- Leplatois P, Le Douarin B, Loison G. High-level production of a peroxisomal enzyme: Aspergillus flavus uricase accumulates intracellularly and is active in Saccharomyces cerevisiae. Gene. 1992;122(1):139-45.

5- Giffard M, Ferté N, Ragot F, El Hajji M, Castro B, Bonneté F. Urate oxidase purification by salting-in crystallization: Towards an alternative to chromatography. PLoS One. 2011;6(5):e19013.

6- Chen Z, Wang Z, He X, Guo X, Li W, Zhang B. Uricase production by a recombinant Hansenula polymorpha strain harboring Candida utilis uricase gene. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;79(4):545-54.

7- Li J, Chen Z, Hou L, Fan H, Weng S, Xu C, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillus flavus urate oxidase in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2006;49(1):55-9.

8- Pfrimer P, de Moraes LM, Galdino AS, Salles LP, Reis VC, De Marco JL, et al. Cloning, purification, and partial characterization of Bacillus subtilis urate oxidase expressed in Escherichia coli. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:674908.

9- Hershfield MS, Roberts LJ 2nd, Ganson NJ, Kelly SJ, Santisteban I, Scarlett E, et al. Treating gout with pegloticase, a PEGylated urate oxidase, provides insight into the importance of uric acid as an antioxidant in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(32):14351-6.

10- Coiffier B, Mounier N, Bologna S, Fermé C, Tilly H, Sonet A, et al. Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of the GRAAL1 (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Trial on Rasburicase Activity in Adult Lymphoma) study. J Clin Oncol. 2003;21(23):4402-6.

11- Lan D, Huang G, Shao H, Zhang L, Ma L, Chen Sh, et al. An improved nonchromatographic method for the purification of recombinant proteins using elastin-like polypeptide-tagged proteases. Anal Biochem. 2011;415(2):200-2.

12- Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. Nat Methods. 2005;2(9):659-61.

13- Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, Namvaran MM, Enayati S, Mirabzadeh Ardakani E, et al. Cloning and expression of Aspergillus flavus urate oxidase in Pichia pastoris. Springerplus. 2014;3:395.

14- Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual. 1st Volume. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

15- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.

16- 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.

17- Fong BA, Wu WY, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. Protein Expr Purif. 2009; 66(2):198-202.

18- Fong BA, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density E. coli fermentation. Microb Cell Fact. 2010;19:77.

19- Shi C, Han TC, Wood DW. Purification of microbially expressed recombinant proteins via a dual ELP split intein system. Methods Mol Biol. 2017;1495:13-25.

20- Guan D, Chen Z. Affinity purification of proteins in tag-free form: Split intein-mediated ultrarapid purification (SIRP). Methods Mol Biol. 2017;1495:1-12.

21- Alishah K, Asad S, Khajeh K, Akbari N. Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme. Enzyme Microb Technol. 2016;93-94:92-8.