

DERLEME

YENİDEN BİRLEŞTİRİLMİŞ PROTEİNLERİN PROTEAZ KULLANILMADAN SAFLAŞTIRILMASINDA İNTEİN ARACILI AYIRMA SÜREÇLERİNİN İNCELENMESİ ÜZERİNE BİR DERLEME

Yakup ERMURAT *

Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu

ÖZET

Bu derleme çalışmasında, yeniden birleştirilmiş proteinlerin proteaz kullanılmadan saflaştırılması süreçlerinde yararlanılan inteinlerin ayrılma etkinliklerinin artırılması için inteinler ve hedef proteinler üzerinde yapılmış araştırmalar incelenmiştir. İntein kullanımı ile protein ayrışması üzerinde yapılan araştırmalar, intein ve protein saflaştırma süreçlerinin daha verimli hale getirilmesini amaçlamaktadır. *In vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleşen süreçlerde, intein ve hedef protein içeren poliklonal Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ürününün çoğaltılması ve ekspres plazmidlerin kopyalanan suşlara taşınması işlemleri yapılmaktadır. İnteinin proteinden ayrılma etkinliği ve ayrılma oranı sabiti kinetikleri, değişik pH, sıcaklık ve süzme sürelerinde belirlenmekte ve hedef proteinlere ilişkili olarak karşılaştırılmaları yapılmaktadır. Araştırmalarda değişik doğal ve yapay inteinlerin protein ayrıştırma etkinlikleri incelenmiş ve yapay *Nostoc punctiforme* (Npu) DnaE C-inteinlerinin ayrışma etkinliklerinin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar amino asit eklenmesine daha yatkın olması nedeniyle C-inteinler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İntein, Yeniden birleştirilmiş protein saflaştırma, Klonlama, Kinetik

A REVIEW ON INTEIN MEDIATED RECOMBINANT PROTEIN PURIFICATION PROCESSES WITHOUT USE OF PROTEASE

ABSTRACT

In this review study, conducted researches on inteins and recombinant proteins to increase splitting activity of inteins that are utilised in recombinant protein purification processes without use of protease have been investigated. Researches on protein cleaving by use of inteins are aimed to make inteins and protein purification processes become more effective. The processes are accomplished *in vivo* and *in vitro* and intein and target protein included polyclonal Polymerase Chain Reaction (PCR) products are cloned than the expressed plasmids are fused to cloned strains. Kinetics of activity of cleaving and activity of cleaving rates were determined in different pH, temperature and filtration times. In the completed researches, protein cleaving activities of different microbial natural and engineered inteins have been investigated and among them the cleaving activity of recombinant *Nostoc punctiforme* (Npu) DnaE C-inteins were found to be very high. The studies are focused on the C-inteins due to their recipient abilities of the amino acid additions.

Keywords: Intein, Recombinant protein purification, Cloning, Kinetics

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, intein ile proteaz enzimi kullanılmadan yeniden birleştirilmiş proteinlerin saflaştırılması süreçlerinde intein etkinliğini ve verimini yükseltmek için yapılan son araştırmalar incelenmiştir. Bu tür proteinlerin saflaştırma sürecinde intein kullanımının tercih edilen önemli nedenleri bulunmaktadır. Biyoteknolojik ürünlerin en önemlilerinden yeniden birleştirilmiş protein ilaçların üretiminde

*Sorumlu yazar: yakupermurat@ibu.edu.tr

saflaştırma sürecinin verimi, özellikle proteaz enzimi kullanımından dolayı düşük ve pahalı olmaktadır. İntein kullanılmadan yapılan saflaştırma etiketinin proteinlerden ayrılması süreçlerinde yaygın hale gelen yöntem, proteaz enzimi kullanılan proteolitik yöntemdir [1-3]. Bu yöntem yüksek saflıkta ve yüksek aktiviteli özel proteaz enzimi gerektirmektedir ki bu enzimatik süreçler çok pahalıya mal olmaktadır. Hedef proteinin enzimatik ayrışma sürecinde etkinliğinin etkilenmesi ve yeni ürünlere dönüşmesi ise bu yöntemin diğer istenmeyen sonuçlarını ortaya çıkarmaktadır. Saflaştırılmış protein karışımı içerisinde yeni bir protein ürününün oluşması ve proteaz enziminin giderilmesi gerekliliği, yeniden saflaştırmayı zorunlu hale getirmektedir. Bu nedenlerle, protein saflaştırmada yeni ve daha kullanışlı bir yöntem ihtiyacı duyulmuştur. İnteinlerin hedef proteinden kendiliğinden ayrılma özellikleri belirlendikten sonra, çekim etiketlerinin proteinden ayrılması sürecinde intein kullanımı benimsenmiştir [4, 5]. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, proteaz temelli protein saflaştırma sistemlerinde standart hale gelmiş olan plazmitteki proteaz tanıma bölümü yerine, intein eklemesi yapılarak füzyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İntein kullanımı ile proteazsız protein saflaştırma sürecini geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda intein kullanımının tercih edilen üstünlükleri ortaya çıkarılmıştır [6, 7].

2. İNTEİN

İnteinlerin kendiliğinden proteinden ayrılma özelliğinin belirlenmesi ile birlikte inteinler protein saflaştırmasında kullanılmaya başlanmıştır. İnteinler herhangi bir polipeptitten kimyasal olarak ayrılabilme veya peptitleri birbirine bağlayabilme özelliklerinden dolayı birçok moleküler çalışmada kullanılmaktadırlar [8-11]. Doğal halde organizmalarda bulunan inteinler ilk defa *Saccharomyces cerevisiae* VMA1 geninden elde edilmiştir [12, 13]. Bu çalışmada 120 kDa büyüklüğündeki VMA1 proteini, protein ayrıştırılması yöntemiyle 50 kDa ve 70 kDa VMA1 proteinlerine ayrılmışlardır.

İnteinler, intein ve ekstein arasındaki peptid bağlarını ayırma işlemi yaparlar. Büyük ve küçük olmak üzere iki çeşitte bulunan inteinler üzerine yapılan araştırmalar geniş alanlara yayılmıştır [14, 15]. Büyük inteinler endonükleaz domaini içerirken mini inteinler endonükleaz domaini çıkarılarak elde edilmektedir. Yapay olarak büyük inteinlerde bulunan endonükleaz domain silinerek mini inteinler elde edilebilmektedir. N-terminal intein (I_N) bölümleri 70–110 amino asit ve C-terminal intein (I_C) bölümleri ise ~40 amino asit dizinlerinden oluşmaktadır [16-18]. Doğal olarak oluşan inteinler, ayırma bölümü ve endonükleaz bölümü olmak üzere iki temel bölümü içermektedirler. Ayırma domaini kendi işleyen bölüm olarak tanımlanır ve kendi kendine bağlı olduğu hedef proteinden ayrılır. Endonükleaz bölümü ise genetik bir element olarak konakçı bir genomda endonükleaz kodu taşıyan geni diğer genlere tutundurur. Endonükleaz geninin büyük inteinden ayrılması ile yapay mini inteinler üretilebilmektedir [19].

İntein aracılı protein uçbirleştirme mekanizması, korunmuş N-ekstein ve C-ekstein nükleofilleri içeren inteinlerin kullanımı ile gerçekleşmektedir. N-terminal ekleme-birleşme peptid bağı üzerine doğrudan bir C-ekstein nükleofili etkisi, intein aracılı protein uçbirleştirme yönteminin temelini oluşturur. İnteinlerin ayırma domaini genetik olarak modifiye edilerek, karboksil (C) terminusu veya amino (N) terminusunda ayrılabilen mutantlar oluşurlar. Doğal oluşan ayırma bölümlerinin (C) sonucunda korunmuş bir sistein amino asidi ve amino (N) sonucunda ise korunmuş bir asparajin amino asidi bulunmaktadır. Bu amino asitlerden herhangi birinin mutasyonu sonucunda meydana gelen ayrılma özellikleri, inteinlerin protein ayrıştırma işlemlerinde kullanılmalarını sağlamaktadırlar. Bu yönde yapılan araştırmalarda amino asidin özelliğinin ayrılma mutantını oluşturduğu ve bu mutantın amino asit-intein ayrılma tepkimesini kontrol ettiği ortaya konmuştur. Bu durum inteinlerin hedef proteinden ayrılmasında denetimin sağlanması için mutant amino asitlerin etkisini önemli hale getirmiştir [20].

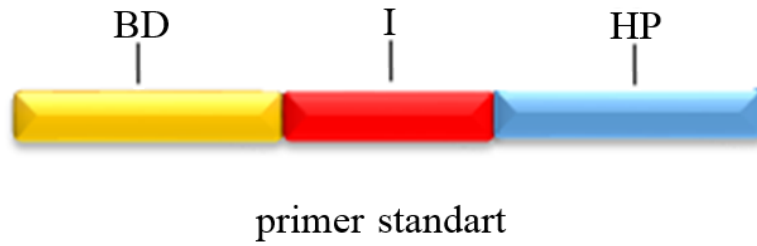
İntein temelli etiketler, çekim dayanağı üzerinde ayrılma tepkimesinin kendiliğinden gerçekleşmesine neden olmakta ve proteinden ayrılmaktadırlar [21, 22]. Kendiliğinden ayrılan intein-çekim etiketi yöntemi geliştirilerek yeniden birleştirilmiş protein saflaştırmasında proteaz kullanımını gerektirmeyen ve böylece proteolitik süreci ortadan kaldıran yeni bir protein saflaştırması dönemine

girilmiştir [23, 24]. Ancak intein kullanılarak yapılan saflaştırmada aşılması gereken sorunların varlığı ortaya çıkmıştır.

İnteinin değişik pH ve sıcaklık ortamlarındaki çevre koşullarında proteinden ayrılma etkinliğinin geliştirilmesi, ayrılma tepkimesinin denetlenebilmesi ve verimliliğin artırılması için yaygın protein çoğaltma ve saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır [25, 26]. İntein ayrılmasında ortaya çıkan sorunların aşılmasıyla hedeflenen uygun verim ve masraf ile yüksek saflıkta ve etkinlikte protein saflaştırması yapmak mümkün olacaktır.

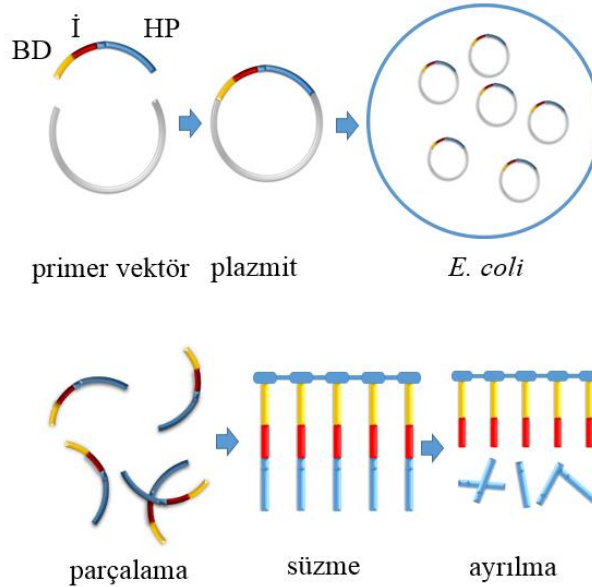
2.1. İntein ile Saflaştırma Süreci

İntein aracılı saflaştırma sürecinde kullanılan birincil standart, bağlanma domaini, intein ve hedef protein olmak üzere dört bölümden oluşan füzyon proteini elde etmeyi içermektedir (Şekil 1).



Şekil 1. İntein aracılı saflaştırma sürecinde kullanılan birincil standart: BD: Bağlanma Domaini, I: İntein, HP: Hedef Protein [33].

İntein ile protein saflaştırma yönteminde, proteaz kullanılarak yapılan her hangi bir protein saflaştırmasında takip edilen kaynaşma yöntemine benzer yöntemler kullanılmaktadır. İçerisinde intein bulunan çember DNA'nın *E. coli* gibi konakçı hücreye kaynaştırılması ile çekim etiketi ve intein bulunduran hedef proteinin çoğaltılması mümkün olmakta, çalışmalarda yaygın olarak maltoz bağlanma proteini (MBP), Beta-Laktamaz (β -lac), yeşil floresan proteini (GFP) yeniden birleştirilmiş protein olarak kullanılmaktadır. Ekspres edilen proteinin saflaştırılması ise özel seçimli bağlanma etiketinin kolona tutunması ve inteinin proteinden kendiliğinden ayrılması aşamalarını içermektedir (Şekil 1) [27, 28].



Şekil 2. İntein saflaştırma sürecinin gösterimi [33]

İntein ile protein saflaştırma sürecinde aşağıdaki işlemler uygulanmaktadır (Şekil 2):

1. “Bağlanma domaini -intein -hedef protein” bölümlerinden oluşan primer tasarımı.
2. Tasarımı yapılmış olan birincillerin sentezi
3. PCR kullanılarak genlerin çoğaltılmasının yapılması
4. Genlerin kısıtlama enzimleri ile kesilmesi
5. Genlerin vektörler içerisine yerleştirilmesi ve plazmit oluşturulması
6. Çember DNA’ların *E. coli*’ye transfer edilmesi
7. Genlerin restriksiyon enzimleri ile iki defa kesilmesi
8. DNA dizininin yapılması
9. Genlerin *E. coli*’ye transfer edilmesi
10. *E. coli*’nin inkubasyonu
11. *E. coli*’nin parçalanması
12. Membran filtre kullanılarak ürünlerin süzülmesi
13. Değişik pH, sıcaklık ve sürelerde inteinlerin kendiliğinden hedef proteinden ayrılması
14. Elde edilen proteinlerin analizlerinin yapılması
15. İnteinlerin proteinlerden ayrılması kinetiğinin incelenmesi

2.2. Fiziksel ve Kimyasal Etkiler

İntein saflaştırma sürecinde tek kolonlu ve herhangi bir kolon kullanılmadan saflaştırma yapmak mümkün olabilmektedir. Tek kolonlu yeniden birleştirilmiş protein saflaştırmasında kendiliğinden ayrılabilen intein ile bağlanma domaininden oluşan çekim etiketi kullanılmaktadır.

N-terminalinde sistein amino asidi içeren inteinler 1,4-ditiyotreitil (DTT) gibi tiyol bileşikleriyle indirgenen ve C-terminalinde asparajin içeren inteinler ise pH etkisiyle indirgenen inteinlerdir.

Tiyol ile indirgenen inteinlerin en yararlı tarafı ayrılma tepkimesinin iyi kontrol edilebilmesidir. Ancak tiyol bileşikler toksik maddeler olduğu için yüksek miktarda kullanımlarında sorun olmaktadır. Ayrıca tiyol içeren ayrılma süreci disülfid bağları bulunduran proteinlerin saflaştırılmasında kullanılamamaktadır.

pH ile uyarılan inteinlerin en önemli avantajı ise kontrol mekanizmasının kolay olması böylece protein saflaştırma sürecini basit hale getirmesidir. Tüm proteinlerin saflaştırılması için uygun olan pH ile indirgeme sürecinde, pH’nın düşürülmesi ile başka kimyasal kullanılmadan intein ayrılması gerçekleşmektedir. Ortam pH’sının 8,5’den 6,2’ye düşürmekle ve bir gece 25°C’de inkubasyon ile intein ayrılması meydana gelmektedir [29]. pH ile intein ayrılması sürecinde karşılaşılan zorluklar ise ayrılma tepkimesinin denetlenemez olması ve olgunlaşmamış ayrılmanın gerçekleşmesidir. Olgunlaşmamış ayrılmanın önüne geçilmesi düşük sıcaklık ortamında çalışma ile gerçekleştirilebilmektedir.

Mycobacterium tuberculosis (Mtu) RecA suşundan elde edilen Δ I-CM intein, herhangi bir tiyol grubu kullanılmadan, basit pH değişimi ile hedef proteinden ayrılabilir. Ayrıca Δ I-CM intein, kitin-bağlanma domain (KBD) veya kolin-bağlanma domain (KoBD) çekim etiketi ve elastin-benzeri polipeptid (EBP) gibi bağlanma çekim etiketleri ile beraber plazmitlere eklenebilmektedir [30, 31].

İntein saflaştırma sürecinde membran tutunma maddesi olarak, kitin ile kuvvetli bağlanma yaptığı için yaygın olarak kitin-bağlanma domainleri kullanılmaktadır. Kitin içeren mikro süzgeçler ve kuyucuklarda KBD’leri kitin ile bağlanma yaparak fazla protein ürün kaybı olmadan süzme gerçekleştirilmektedir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ile birkaç defa yıkanan KBD’lerin kitinden ayrılmasıyla kitinin yeniden kullanımı mümkün olmaktadır [32].

Elastin-benzeri-poliipeptit (EBP) çekim etiketi ile intein kullanılarak yapılan protein saflaştırma sürecinde kitin gibi herhangi bir reçineye ihtiyaç duyulmadan membran süzmesi ile işlem yapılması başarılmıştır [33]. EBP etiketi ile süzme işlemi, EBP'nin sıcaklık ve iyonik dayanıklılığa bağlı geridönüslü çöktürülmesi ile gerçekleşmektedir. Ortama amonyum sülfat ilavesi, geridönüslü EBP etiketinin çökmesine neden olmaktadır. EBP presipitasyon işleminden sonra yaklaşık 1,2 µm geçirgen filtrede süzülerek EBP'nin membran ile tutunması sağlanabilmektedir [34].

2.3. Kinetik Oranlar

İntein etkinliğini artırmak amaçlı yapılan çalışmalardan bir diğeri ise vektörlere amino asit eklenmesidir. Bu çalışmalardan biri olan *E. coli* RNA polimeraz A (MQG)'nin ilk üç amino asidinin eklenmesi ile intein etkinliğinde önemli artış gerçekleştiği ortaya çıkmıştır. Amino asit eklenmesi ile ilgili olarak yeşil floresan proteinin (YFP) üç amino asidi değiştirilmiş ve intein ayrılmasının daha da hızlandığı ortaya çıkmıştır. Daha önceki çalışmalarda intein etkinliğini artırıcı yönde etkilediği belirlenmiştir. ΔI-CM sisteminde, *E. coli* RNA polimeraz A (RpoA) ve insan asidik fibroblast büyüme faktörü (aFBF) amino asitlerinin, intein ile yeşil floresan proteinin (YFP) arasına eklenmesi ile aşırı yüksek ayrılma kinetiği elde edilmiştir [35]. Özellikle RpoA'nin ilk üç amino asidinin uygulanması ile doğal YFP amino asitlerine göre intein ayrılma kinetik sabitinde (k) iki kat daha fazla bir değer elde edilmiştir [36].

İnteinler ile protein ayrılması işlemine amino asitlerin etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada, C-terminal ve N-terminal ayrışmaları üzerine Asn, Gln, His ve Ala amino asitlerinin etkileri *in vitro* koşullarda incelenmiş ve kinetik analizleri yapılarak birinci dereceden oran sabitleri belirlenmiştir. C terminal Gln amino asidi yerine Asn amino asidinin eklenmesi ile hız sabitinin 3 kat arttığı ortaya çıkmıştır [37].

Doğal ve yapay inteinler ile *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda ise protein bağlanması ve ayrılması incelenmiştir. Bu çalışmada *Synechocystis sp. (Ssp)* DnaE inteinine göre yapay olarak hazırlanmış kısa *Nostoc punctiforme (Npu)* DnaE C-inteinlerinin daha fazla amino asit eklenmesi özelliğine ve protein ayrıştırma etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir [38]. Bir başka çalışmada, *Ssp* inteinlerinin *Npu* inteinlere kıyasla daha hızlı ayrıştığı gösterilmiştir. *Ssp* DnaE PCC6803 ve *Npu* inteinlerindeki yeni işlevsel bölünme bölgeleri tanımlanmış ve C terminalleri 15 artığa indirilmiştir. Sonuçta, işlenmiş bölünmüş inteinlerin, doğal olarak oluşan bölünmüş DnaE inteinlerden daha yüksek protein ayrışma etkinliği gösterdiği belirlenmiştir [39].

Optimum protein ayrılma etkinliği, 25 amino asit ile doğal olarak oluşan AceL-TerL N-terminal intein fragmanı ile incelenmiş ve 8° C'lik düşük sıcaklıkta yaklaşık % 90'lık bir verim elde edilmiştir. Yapay olarak bölünmüş olan *Ssp* DnaB intein'in M86 mutanı ile karşılaştırılmış ve doğal olarak bölünmüş bir intein için dikkate değer bir sonucun ortaya çıktığı gösterilmiştir [40].

3. SONUÇ

İntein ile protein ayrılması konusunda yapılan araştırmalarda değişik mikrobik kaynaklardan elde edilen doğal ve yapay C ve N inteinlerinden yapay C-inteinlerin protein ayrıştırma etkinliklerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapay C-inteinlerin amino asit eklenmesine daha yatkın olduğu belirlenmiş ve yapay *Nostoc punctiforme* DnaE C-inteinlerinin ayrışma etkinliklerinin en yüksek olduğu kanıtlanmıştır. Araştırmalar, intein etkinliğinin artırılması ve denetimli hale getirilmesi için yapılan çalışmaların C-inteinler üzerine yoğunlaşması gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

TEŞEKKÜR

İntein ile protein saflaştırma konusunda Uygulamalı Protein Mühendisliği Laboratuvarında eğitim almamı sağlayan Ohio State Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya ve Biyomoleküler Mühendislik Bölümü hocalarından Prof Dr David Wood ve laboratuvar arkadaşlarına çok teşekkür ederim.

Acknowledgments: I would like to thank Prof Dr David Wood and the laboratory group from the Ohio State University Faculty of Engineering Department of Chemical and Biomolecular Engineering, who granted me with training in protein purification with intein in their Applied Protein Engineering Laboratory.

KAYNAKLAR

- [1] Wood DW. Simplified protein purification using engineered self-cleaving affinity tags. *J Chem Technol Biotechnol*, 78: 103–110, 2003. doi:10.1002/jctb.762
- [2] 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*, 14:1387–1395, 2005. doi: 10.1110/ps.041296305
- [3] Wood DW, Camarero JA. Intein applications: from protein purification and labeling to metabolic control methods. *J Biol Chem*, 289: 14512–14519, 2014.
- [4] Elleuche S, Nolting N, Pöggeler S. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 479–489, 2010.
- [5] Wood DW, Derbyshire V, Wu W, Chartrain M, Belfort M, Belfort G. Optimized single-step affinity purification with a self cleaving intein applied to human acidic fibroblast growth factor. *Biotechnol Prog*, 16: 1055–1063, 2000.
- [6] Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 48: 1-13, 2006. doi:10.1016/j.pep.2005.12.002
- [7] Chong S, Xu MQ. Protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein without the endonuclease motifs. *J Biol Chem* 272: 15587–155890, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.25.15587
- [8] Shah N H, Muir TW. Inteins: nature's gift to protein chemists. *Chem Sci*, 5: 446–461, 2014.
- [9] Perler FB. Protein Splicing Mechanisms and Applications. *IUBMB Life*. 57(7): 469 – 476, 2005.
- [10] Miraula M, Enculescu C, Schenk G, Mitić N. Inteins—A Focus on the Biotechnological Applications of Splicing-Promoting Proteins. *American Journal of Molecular Biology*, 5: 42-56, 2015.
- [11] Gogarten JP, Senejani AG, Zhaxybayeva O, Olendzenski L, Hilario E. Inteins: structure, function, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, 56: 263–287, 2002. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160741
- [12] Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. and Anraku, Y. Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 265: 6726–

- 6733, 1990.
- [13] Kane PM, Yamashiro, CT, Wolczyk DF, Neff N, Goebel M, Stevens TH. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase. *Science*. 250: 651-657, 1990.
- [14] Li Y. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 33: 869-881, 2011. doi:10.1007/s10529-011-0533-8
- [15] Mathys S, Evans TC, Chute IC, Wu H, Chong S, Benner J, Liu XQ, Xu MQ. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene*. 231: 1–13, 1999. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00103-1
- [16] Belfort M, Derbyshire V, Stoddard BL, Wood DW. *Homing endonucleases and inteins*. Berlin Heidelberg, Springer. 2005. New York.
- [17] Mills KV, Perler FB. "The mechanism of intein-mediated protein splicing: variations on a theme." *Protein and peptide letters*, 12 (8): 751-755, 2005.
- [18] Zhao Z, Lu W, Dun B, Jin D, Ping S, Zhang W, Chen M, Xu MQ, Lin M. Purification of green fluorescent protein using a two-intein system. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 77: 1175–1180, 2008. doi: 10.1007/s00253-007-1233-0.-009-9921-8
- [19] Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, Perler FB, Benner J, Kucera RB, Hirvonen CA. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 192: 271–281, 1997.
- [20] Wood D, Wu W, Derbyshire V, Belfort G, Belfort M. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nature Biotechnology*, 17: 889-892, 1999.
- [21] Terpe K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl, Microbiol, Biotechnol*, 60: 523–533, 2003.
- [22] Ford CF, Suominen I, Glatz CE. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 2: 95–107, 1991.
- [23] Gillies AR, Hsui JF, Oak S, Wood DW. Rapid cloning and purification of proteins: gateway vectors for protein purification by self-cleaving tags. *Biotechnol Bioeng*, 101: 229–240, 2008. doi: 10.1002/bit.21974
- [24] LaVallie ER, McCoy JM. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol*. 6: 501–506, 1995.
- [25] Singleton SF, Simonette RA, Sharma NC, Roca A. Intein-mediated affinity-fusion purification of the *Escherichia coli* RecA protein. *Protein Expr. Purif*. 26: 476–488, 2002. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00571-5
- [26] Saez NJ, Vincentelli R. High-throughput expression screening and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, 1091: 33-53, 2014. doi:10.1007/978-1-62703-691-7_3
- [27] Coolbaugh MJ, Wood DW. Purification of *Escherichia coli* proteins using a self-cleaving chitin-binding affinity tag. *Methods in Molecular Biology*, 1177: 47-58, 2014. doi:10.1007/978-1-4939-

1034-2_4

- [28] Mills KV, Johnson MA, Perler FB. Protein Splicing: How inteins escape from precursor proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(21): 14498–14505, 2014. <http://doi.org/10.1074/jbc.R113.540310>
- [29] Luan C, Xie YG, Pu YT, Zhang HW, Han FF, Feng J, Wang YZ. Recombinant expression of antimicrobial peptides using a novel self-cleaving aggregation tag in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 60:113-120, 2014.
- [30] Coolbaugh MJ, Tang MJS, Wood DW. High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. *Analytical Biochemistry*, 516: 65-74, 2017.
- [31] Caubin J, Martin H, Roa A, Cosano I, Pozuelo M, de La Fuente JM, Sanchez-Puelles JM, Molina M, Nombela C. Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 74: 164-171, 2001.
- [32] Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12): 6705-10, 1998.
- [33] Ge X, Yang DS, Trabbic-Carlson K, Kim B, Chilkoti A, Filipe CD. Self-cleavable stimulus responsive tags for protein purification without chromatography. *J Am Chem Soc*, 127: 11228–11229, 2005. doi: 10.1021/ja0531125
- [34] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*, 2: 659–66, 2005.
- [35] Fong BA, Gillies AR, Ghazi I, LeRoy G, Lee KC, Westblade LF, Wood DW. Purification of *Escherichia coli* RNA polymerase using a self-cleaving elastin-like polypeptide tag. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 19: 1243-1252, 2010. doi:10.1002/pro.403
- [36] Coolbaugh MJ. Recent advances in self-cleaving intein tag technology, PhD Dissertation, The Graduate School of The Ohio State University Graduate Program in Chemical Engineering. The Ohio State University Columbus OH. 2015.
- [37] Mills KV, Dorval D M, Lewandowski KT. Kinetic analysis of the individual steps of protein splicing for the *Pyrococcus abyssi* PolII Inteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 4, 2714–2720, 2005. doi:10.1074/jbc.M412313200
- [38] Stevens AJ, Brown ZZ, Shah NH, Sekar G, Cowburn D, Muir TW. Design of a split intein with exceptional protein splicing activity. *J Am Chem Soc*, 138: 2162–2165, 2016.
- [39] Aranko AS, Züger S, Buchinger E, Iwai H. *In vivo* and *in vitro* protein ligation by naturally occurring and engineered split DnaE inteins. *PLoS ONE*. 4(4): e5185, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005185.g001
- [40] Thiel IV, Volkmann G, Pietrokovski S, Mootz HD. An atypical naturally split intein engineered for highly efficient protein labeling. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(5): 1306-1310, 2014.