



کلون، بیان، تخلیص و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 حاصل از *Pseudomonas sp.* RS-16 در میزبان *E.coli*

رضا عالیزاده: کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
نسرین کاردانی: کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
عاطفه خداکرمی: کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
خسرو خواجه: استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
بهاره دبیرمنش: استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (* نویسنده مسئول). dabirmanesh@modares.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

وراکساز،
متوتروکسات،
داروی نادر،
کلونینگ،
کربوکسی پپتیداز G2

زمینه و هدف: متوتروکسات یکی از داروهای پرمصرف در شیمی درمانی است که نارسایی کلیوی یکی از عوارض جانبی آن است. آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 (گلوکارپیداز تحت نام تجاری وراکساز) آنزیمی باکتریایی است که میتواند متوتروکسات را به متابولیت‌های غیرفعال خود تبدیل کند و پس از درمان با دز بالای متوتروکسات، منجر به حذف آن از مسیر غیرکلیوی می‌شود.
روش کار: در این پروژه ابتدا ژن کربوکسی پپتیداز G2 به دست آمده از سایت NCBI (Accession number: NC_015517) در داخل وکتور pUC57 توسط شرکت Gene Cust سنتز شد. سپس برای ادامه روند، وکتور pUC57 که حاوی ژن کربوکسی پپتیداز G2 بود از باکتری استخراج شد و به عنوان الگو در واکنش PCR به همراه پرایمرهای دارای سایت برش NdeI و XhoI مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن بر روی محصول PCR هضم آنزیمی صورت گرفت و در بین سایت‌های مورد نظر در وکتور بیانی pET28a کلون گردید. در نهایت پلاسمید نو ترکیب به داخل سویه بیانی *E. coli* BL21 ترانسفورم شد و تعدادی از پلاسمیدهای تایید شده از طریق Colony PCR برای تعیین توالی با پرایمر T7 promoter و T7 terminator، ارسال شدند. نتایج تعیین توالی نیز حضور ژن را تایید کردند، پس از آن بیان تحت شرایط بیانی مختلف بهینه گردید.

یافته‌ها: بیشترین سطح بیان در غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و مدت زمان انکوباسیون ۶ ساعت تعیین شد. در انتها پروتئین مورد نظر از طریق کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز تخلیص و ویژگی‌های سینتیکی آن بررسی شد. pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۷ و ۲۵°C به دست آمد. برای سوبسترای متوتروکسات $K_m = 24 \mu M$ و $V_{max} = 0.05431 \mu mol/min$ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه به منظور تولید و فراوری آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 بوده و در آینده این آنزیم می‌تواند کاندیدای بالقوه‌ای برای کاهش اثرات جانبی شیمی درمانی باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Alizadeh R, Kardani N, Khodakarami A, Khajeh Kh, Dabirmanesh B. Cloning, expression and characterization of carboxypeptidase G2 enzyme from *Pseudomonas sp.* strain RS-16 in *E.coli*. Razi J Med Sci. 2019;26(10):8-18.

* انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

Cloning, expression and characterization of carboxypeptidase G2 enzyme from *Pseudomonas* sp. strain RS-16 in *E.coli*

Reza Alizadeh, MSc, Biochemistry Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbit Modares University, Tehran, Iran

Nasrin Kardani, MSc, Biochemistry Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbit Modares University, Tehran, Iran

Atefeh Khodakarami, MSc, Biochemistry Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbit Modares University, Tehran, Iran

Khosro Khajeh, Professor, Biochemistry Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbit Modares University, Tehran, Iran

Bahareh Dabirmanesh, Assistant Professor, Biochemistry Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbit Modares University, Tehran, Iran (*Corresponding author) dabirmanesh@modares.ac.ir

Abstract

Background: Methotrexate is one of the most widely used chemotherapeutic agents that may cause kidney failure as a side effect. Carboxypeptidase G2 (Glucarpidase marketed under the brand name of Voraxaze) is a bacterial enzyme that can convert methotrexate to its inactive metabolites and provides an alternative non-renal pathway for methotrexate elimination in patients with renal dysfunction during high-dose methotrexate treatment.

Methods: In this research, carboxypeptidase G2 was synthesized in pUC 57 vector. Then it was subcloned into pET28a between NdeI and XhoI restriction sites. Recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 and its expression was examined in various conditions.

Results: The optimum expression of recombinant protein was obtained at the concentration of 0.5 mM IPTG, 25 ° C, 6 h. Then the active enzyme was purified by Nickle affinity chromatography. Optimal pH and temperature of enzyme was 7 and 25 ° C respectively. The K_m and V_{max} for methotrexate were 24 μ M and 0.005431 μ mol/min.

Conclusion: The present study was conducted to produce recombinant carboxypeptidase G2 and to improve its production efficiency. In future, this enzyme could be a potential candidate for preventing chemotherapy side effects.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Voraxaze,
Methotrexate,
Orphan Drug,
Cloning,
Carboxypeptidase G₂

Received: 14/07/2019

Accepted: 01/12/2019

Cite this article as:

Alizadeh R, Kardani N, Khodakarami A, Khajeh Kh, Dabirmanesh B. Cloning, expression and characterization of carboxypeptidase G2 enzyme from *Pseudomonas* sp. strain RS-16 in *E.coli*. Razi J Med Sci. 2019;26(10):8-18.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



پروتئین همودایمری با وزن مولکولی 2×41800 دالتون می‌باشد (۶).

در سال ۱۹۷۱ کربوکسی پپتیداز G1 از *Pseudomonas stutzeri* جدا شد و با آنزیم مطالعات اولیه مقایسه شد، مشاهده گردید که به طور طبیعی فولات را کاهش می‌دهد (شامل ۵- متیل تتراهیدروفولات و ۲,4- diamino-N10 methylpteroic acid) که به عنوان فاکتورهای lecovorin و citrovorum شناخته می‌شوند. در سال ۱۹۸۳ ژن کربوکسی پپتیداز G2 از سودوموناس جدا شد، سپس در *E. coli* و بعد از آن در *Pseudomonas putida* بیان شد. کربوکسی پپتیداز G2 نیاز به کاتیون‌های دو ظرفیتی روی دارد و شامل دو زیر واحد حدود ۴۲ کیلو دالتونی می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها هم بعداً تعیین شدند. بیان بالای این پروتئین هموزن زمینه خالص‌سازی آن را فراهم کرد. این مطالعه نشان داد که در بین این خانواده از آنزیم‌ها، کربوکسی پپتیداز G2 بهترین قابلیت را برای تمایز بین متوتروکسات و ۵- متیل تتراهیدروفولات دارد، بنابراین فرم در گردش فولات مسیر را برای استفاده از کربوکسی پپتیداز G2 هموار می‌کند. بنابراین کاربرد کلینیکی این آنزیم گسترش پیدا کرد.

آنزیم کربوکسی پپتیداز تا به حال بیشتر از گونه‌های سودوموناس فلاونوباکترها جدا شده است. بررسی‌ها نشان داده که آنزیم‌های جدا شده از گونه‌های مختلف شباهت ساختاری زیادی با هم دارند (۷و ۸). این آنزیم از دو زیر واحد یکسان تشکیل شده که هر زیر واحد واجد ۲ اتم روی است. این آنزیم متوتروکسات در گردش را به متابولیت غیرفعال ۴۲ و دی آمینو-N10- متیل پتروئیک اسید (DMAP) متابولیزه کرده و روش دیگری را برای دفع کلیوی متوتروکسات مهیا می‌سازد (۹ و ۱۰). اخیراً دارویی تحت عنوان وراکساز (Voraxaze) توسط شرکت آمریکایی BTG International Inc عرضه شده (۵) که از آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 در آن بهره برده است. این دارو به صورت ویال حاوی ۱۰۰۰ واحد آنزیمی با قیمت

با توجه به سرعت زیاد تکثیر سلول‌های سرطانی نیاز زیادی به فولات احیا شده در این سلول‌ها می‌باشد. کاهش میزان فولات در این سلول‌ها به عنوان راهکاری برای درمان سرطان در نظر گرفته شده و داروهایی در این خصوص طراحی شده است. یکی از آنالوگ‌های فولات که به عنوان داروی مؤثر در درمان سرطان کاربرد وسیعی دارد، متوتروکسات Methotrexat (MTX) است. متوتروکسات که آنالوگ سنتتیک فولات می‌باشد (۱). از سال ۱۹۴۸ یک ترکیب مهم در شیمی درمانی می‌باشد. اثر این دارو و متابولیت‌های آن از طریق مهار DHFR منجر به مهار سنتز DNA، ترمیم و همانندسازی می‌گردد که منجر به مرگ سلول‌های در حال تکثیر زیاد می‌گردد. متوتروکسات در درمان بیماری‌هایی چون رماتوئید آرترایتیس، مولتیپل اسکلروز و پسوریازیس (Psoriasis) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). این داروی سمی مدتی پس از تزریق به مرور توسط کلیه‌ها دفع می‌گردد تا تأثیری بر سلول‌های سالم نگذارد. متوتروکسات را می‌توان با دامنه دوز وسیع تجویز کرد، از ۲۰ mg/ml در هفته برای درمان لوکمی لیمفوبلاستی و بیماری‌های غیرسرطانی از جمله آرتریت روماتوئید و مواقعی که با لوکوورین ترکیب می‌شود تا دوزهای ۳۳۰۰۰-۱۰۰۰ mg/ml. در دوزهای ۳۳۰۰۰-۱۰۰۰ mg/ml که اصطلاحاً متوتروکسات دز بالا گفته می‌شود (۳). معمولاً به عنوان یک تزریق بلندمدت تجویز می‌شود که در بیماران با عملکرد کلیوی نرمال از طریق مصرف بیش از حد آب و قلیایی سازی برای افزایش حلالیت متوتروکسات در ادرار تنظیم کرد. اما در مواردی این دوز بالا باعث بروز آسیب در کلیه‌ها می‌گردد که در این صورت دفع دارو به خوبی انجام نگرفته و اثرات سمی آن بر سایر سلول‌ها بروز می‌نماید. یکی از راه‌های حذف این دارو تجزیه آنزیمی آن می‌باشد. گلوکارپیداز آنزیمی است که متوتروکسات را به ترکیباتی با سمیت کمتر تبدیل می‌کند (۴ و ۵). گلوکارپیداز یا کربوکسی پپتیداز G2 متالوآنزیم باکتریایی سودوموناس از سویه RS-16،

محیط کشت LB آگار (جامد) واجد آمپی سیلین ۱۰۰ mg/ml، کانامایسین ۵۰ mg/ml و فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شدند از کلونی های رشد کرده روی محیط حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، یک پلیت مادر تهیه شد. با استفاده از پرایمرهایی که برای تکثیر قطعه ژنی استفاده شدند، PCR Colony بر روی تعدادی از کلونی ها انجام شد. از کلونی هایی که حاوی ژن تشخیص داده شدند، استخراج پلاسمید انجام گرفت و این پلاسمیدها با مارکر سایز مناسب روی ژل مشاهده شدند. تعدادی از پلاسمیدهای تایید شده با این روش ها برای تعیین توالی با پرایمر T7 promotor و T7 terminator، ارسال شدند.

بیان پروتئین: ابتدا تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نو ترکیب مورد نظر، در حجم ۱۰ mL محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس به نسبت ۱:۱۰۰ در ۱۰۰ mL محیط کشت جدید تلقیح شده و در انکوباتور در دمای 37°C با دور ۲۰۰ rpm منتقل شد و بعد از رسیدن به OD برابر ۰/۵ غلظت های مختلف IPTG (۰/۲۵، ۰/۵، ۱) دما (۲۵ و ۳۷) و زمانهای متفاوت (۲، ۴، ۶ و ۱۰ ساعت) بررسی گردید. بیان بهینه در با غلظت نهائی غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت تعیین شد. سلول ها پس از ۶ ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع آوری شدند (۴ min, 4°C , ۲۰ g, ۱۲۰۰۰). در مرحله بعد رسوب به دست آمده در بافر تریس ۴۰ میلی مولار pH ۸ حاوی NaCl ۳۰۰ میلی مولار و ایمیدازول ۵ میلی مولار بر روی یخ sonicate شد. این عمل به مدت ۱۰ دقیقه و در هر دقیقه ۲۰ ثانیه سلول ها سونیکه می شدند و ۴۰ ثانیه روی یخ می ماندند. سلول های شکسته شده با سانتریفیوژ با دور $12000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد ته نشین شدند. سپس همه نمونه ها به همراه بافر نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند. برای آنالیز بیان پروتئین نو ترکیب نمونه ها بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بارگذاری شدند و توسط بریلیانت بلو G-۲۵۰ رنگ آمیزی گردیدند.

تخلیص پروتئین: به منظور تخلیص آنزیم، از روش کروماتوگرافی تمایلی (Affinity Chromatography) و

حدود ۲۷،۰۰۰ دلار در آمریکا به فروش می رسد. قابل ذکر است که مقدار مصرف در هر بار استفاده ۵۰ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار می باشد. یعنی هزینه تنها یک بار استفاده از دارو در مورد یک بیمار با وزن ۷۰ کیلوگرم بدون در نظر گرفتن هزینه های واردات، در حدود ۹۳،۸۰۰ دلار برآورد می شود (۵). با توجه به اهمیت این آنزیم، در این مطالعه ابتدا ژن آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 بهینه و سپس در pUC 57 سنتز شد. ژن سنتز شده در حامل بیانی pET 28 کلون گردید و شرایط بیان بهینه به دست آمد. پس از تخلیص آنزیم شرایط بهینه دما و pH بهینه فعالیت مطالعه و پارامترهای سینتیکی آنزیم محاسبه شد.

روش کار

آنزیم های مورد نیاز (پلیمراز، محدودگر Nde1 و Xho1 و...) (Sigma Co)، مواد مورد استفاده در تهیه ژل اکریل آمید و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز (Merck Co) جهت انجام آزمایشات آماده گردید. در این پژوهش از باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان اختصاصی برای کلونینگ و بیان ژن کلون شده استفاده شد.

کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز G2 در باکتری *E. coli* توالی ژن آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 از بانک ژنی NCBI (Accession number : ACY05517) یافت شد این ژن در باکتری سودوموناس وجود داشت و با توجه به اینکه برای انجام این پروژه باید ژن در میزبان بیان *E. coli* ترانسفرم می شد. با توجه به ارجحیت کدونی باکتری *E. coli* ژن کربوکسی پپتیداز G2 توسط شرکت GeneCust بهینه شد، و سپس سنتز ژن در بین دو سایت برش NdeI و XhoI توسط این شرکت در وکتور pUC57 انجام گردید. از آنجا که برای ادامه روند کار باید ژن در داخل وکتور pET28 کلون می شد با کمک نرم افزار Oligo analyzer پرایمرهای مورد نظر طراحی و مراحل کلونینگ انجام شد و نهایتاً پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به داخل باکتری *E. coli* سویه بیانی BL21 (DE3) ترانسفرم گردید. پس از ایجاد وکتور نو ترکیب و بعد از ترانسفرم کردن آن در سلول های *E. coli* BL21، سلول های ترانسفرم شده در

تعیین پارامترهای سینتیکی: پارامترهای سینتیکی آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 با استفاده از سوبسترای متوترواکسات با رسم و بررسی منحنی میکائیلیس منتن توسط برنامه prism به دست آمد. بدین منظور فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف این سوبسترا در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. همچنین Specific Activity برای سوبسترای متوترواکسات محاسبه شد.

یافته‌ها

کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز G2: ابتدا توالی ژنی مربوط به آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 در وکتور pUC57 بین دو سایت برش NdeI و XhoI بهینه و سنتز شد. پس از سنتز جهت تکثیر پلاسمید مورد نظر به *E. coli* DH5α منتقل شد و پس از رشد استخراج پلاسمید صورت گرفت. پلاسمید به دست آمده برای تایید حضور ژن مورد نظر، توسط آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI مورد هضم دوگانه قرار گرفت، در اثر هضم توسط آنزیم‌های محدودکننده قطعه ژنی وارد شده در محدوده بین ۱۱۰۰ جفت باز و ۱۵۰۰ جفت باز قرار گرفت و وکتور خطی شده در محدوده ۳۰۰۰ جفت باز قرار گرفت. پلاسمید pET28a نیز توسط آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI هضم دوگانه شد. محصول هضم شده بر روی ژل برده شد و صحت هضم آنزیمی با ایجاد تک باند در محدوده ۵۰۰۰ جفت باز مورد تایید قرار گرفت.

قطعه ژنی مورد نظر حاصل از هضم پلاسمید pUC57 و محصول حاصل از هضم pET28a پس از استخراج از ژل برای انجام واکنش الحاق بکار برده شدند. سپس محصولات حاصل از الحاق به باکتری *E. coli* BL21 انتقال پیدا کرد. از سویه‌های مثبت پلاسمید استخراج شد. هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب pET28a با آنزیم‌های NdeI و XhoI برای تایید وارد شدن ژن مورد نظر به وکتور pET28a انجام شد.

پس از تایید کلون ژن مورد نظر در پلاسمید pET28a، پلاسمیدهای نوترکیب برای تعیین توالی ارسال شد. نتیجه تعیین توالی ژن مورد نظر بررسی شد و مشخص شد توالی بدون جهش است. نتایج تعیین توالی نیز حضور ژن را تایید کردند و شباهت ۱۰۰٪ را نشان دادند.

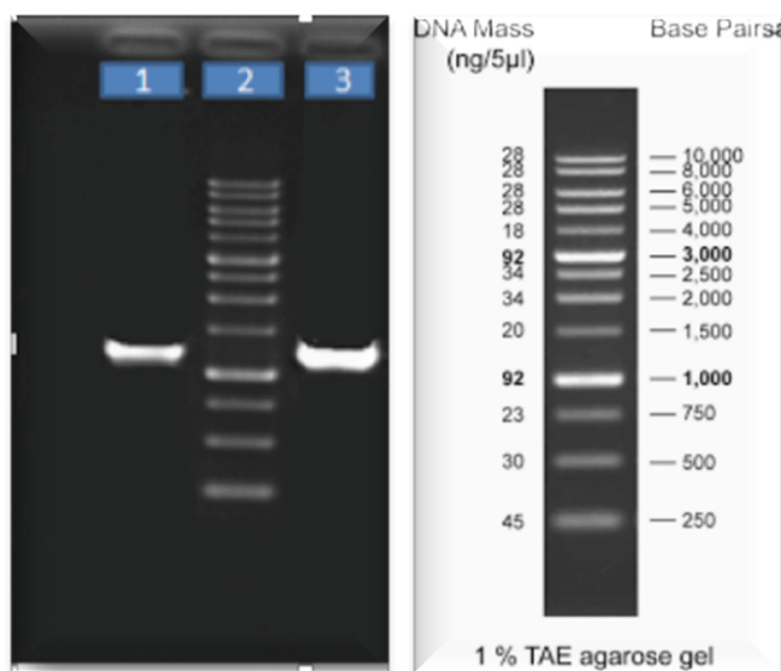
از ستون نیکل سفارز (Nickel - Sepharose) استفاده شد. آنزیم نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی (His₆-tag) در انتهای آمین (N-Terminal) خود می‌باشد. این دنباله هیستیدینی دارای تمایل زیادی به نیکل بوده و میانکش محکمی با آن برقرار می‌کند. بدین منظور، ابتدا ستون توسط بافر تریس ۴۰ میلی مولار دارای ۵ میلی مولار ایمیدازول و ۳۰۰ میلی مولار نمک NaCl به تعادل رسید. سپس عصاره سلولی به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصل نشده به ستون به وسیله بافر شستشو (Washing Buffer) انجام شد و در آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) استفاده شد. بافر جدا کننده (Elution Buffer) حاوی تریس ۴۰ میلی مولار به همراه ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار و نمک NaCl ۳۰۰ میلی مولار با pH ۸ می‌باشد.

رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. خلوص و تعیین وزن مولکولی نمونه تخلیص شده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بر طبق روش Laemmli کنترل شد.

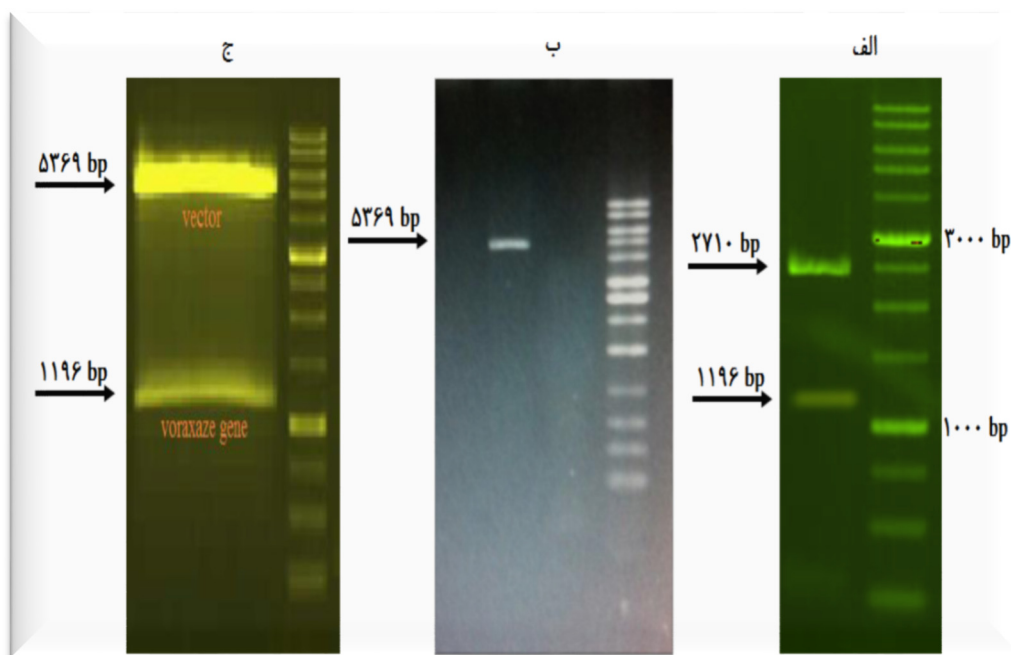
تعیین فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز در دمای اتاق در حضور سوبسترای اصلی این آنزیم متوترواکسات به روش سینتیکی مورد بررسی قرار گرفت. در مخلوط آزمایش، اکسیداسیون متوترواکسات ۳۴ میلی مولار در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ۸ pH با کاهش جذب در ۳۲۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد ($\epsilon = 8300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

تعیین pH بهینه آنزیم برای سوبسترای متوترواکسات: به منظور یافتن pH بهینه، فعالیت آنزیم در مخلوط پلی بافری حاوی تریس ۵۰ میلی مولار، سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، سیتریک اسید ۵۰ میلی مولار و گلیسین ۵۰ میلی مولار با استفاده از سوبسترای متوترواکسات در دامنه pH (۳-۹) مورد سنجش قرار گرفت.

تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم: به منظور یافتن دمای بهینه، فعالیت آنزیم در مخلوط بافری حاوی پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با استفاده از سوبسترای متوترواکسات در دامنه دمای ۵-۵۵ درجه سانتی گراد مورد سنجش قرار گرفت.



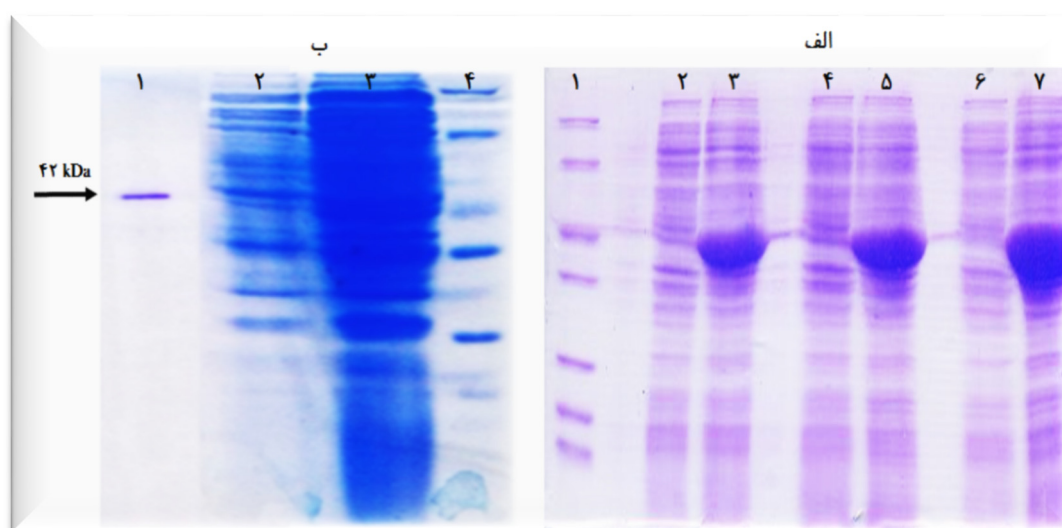
شکل ۱- نمونه ۱: نمونه PCR بر روی ژل اولیه سنتز شده، نمونه ۲: DNA ladder، نمونه ۳: نمونه PCR بر روی ژل کلون شده.



شکل ۲- مراحل کلونینگ. الف) ژل هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI وکتور نوترکیب pUC57: باند مربوط به پلاسمید خطی pUC57 باند مربوط به ژن جدا شده از پلاسمید بعد از هضم آنزیمی ب) پلاسمید pET28a خطی شده بوسیله هضم آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI ج) ژل فرایند هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده NdeI و XhoI پلاسمید خطی شده در ناحیه بین 5000 bp مشخص است.

شرایط بیان با مقادیر بالایی از پروتئین محلول و فعال، شرایط مختلف بیانی (غلظت‌های مختلف IPTG، دما و زمان) سنجیده شد و در نهایت بهترین شرایط بیان با غلظت ۵/۰ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی

بررسی بیان پروتئین: بعد از اطمینان کامل از درست بودن توالی ژن سنتز شده، به منظور بیان پروتئین نوترکیب، باکتری نوترکیب در محیط کشت LB مایع کشت داده شد. سپس برای به دست آوردن بهترین



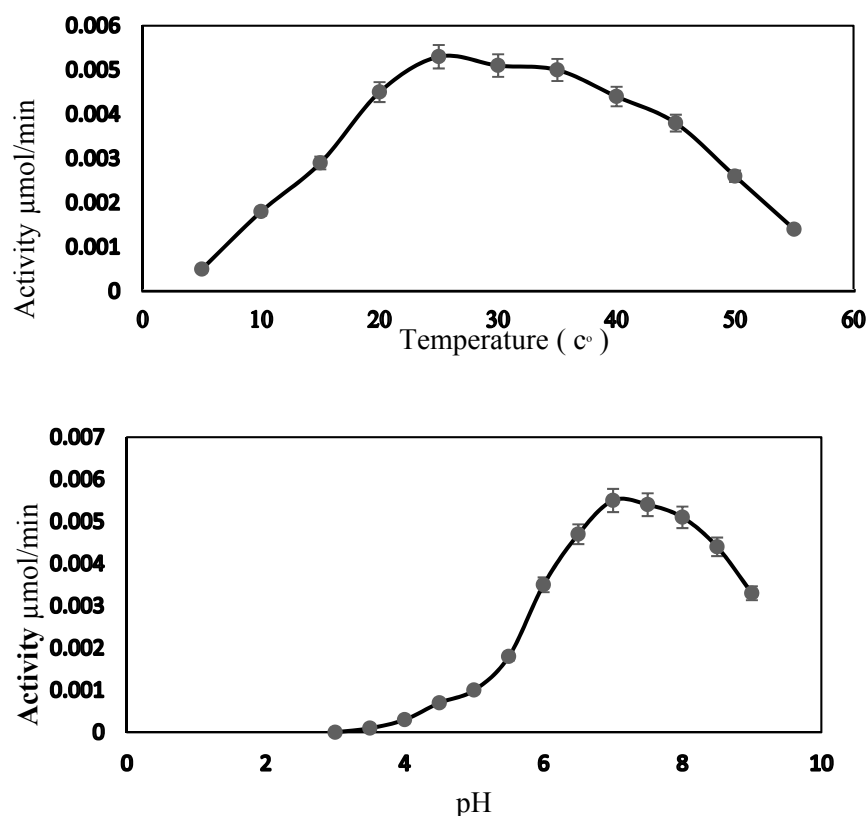
شکل ۳- الف) آنالیز بیان پروتئین کربوکسی پپتیداز G2 (۱): پروتئین مارکر - ۲: قبل القا زمان ۲ ساعت - ۳: بعد القا زمان ۲ ساعت - ۴: قبل القا زمان ۴ ساعت - ۵: بعد القا زمان ۴ ساعت - ۶: قبل القا زمان ۶ ساعت - ۷: بعد القا زمان ۶ ساعت). نمونه از ژل های الکتروفورز در زمانه های مختلف، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و غلظت ۰/۵ میلی مولار IPTG (شکل ب) نمونه ۱: پروتئین تخلیص شده توسط ستون نیکل سفارز

C آنزیم در داخل دُمین کاتالیتیک و در هسته آبگریز قرار دارند، لذا His-tag پروتئین در دسترس نبوده و در فرآیند تخلیص مشکل ساز شد. برای رفع این موضوع در بافر تخلیص از اوره ۸ مولار استفاده شد تا آنزیم کاملاً باز شده و His-tag موجود در انتهای N پروتئین در معرض نیکل موجود در ستون کروماتوگرافی قرار گیرد. با استفاده از این دستورالعمل تخلیص پروتئین به راحتی در مرحله اول صورت گرفت و پروتئین در غلظت ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول تخلیص شد. پروتئین تخلیص شده در محلول رویی، تک باند با وزن مولکولی مونومری حدود ۴۲،۲۱۱ کیلو دالتون بر روی ژل SDS-PAGE دیده شد (شکل ۳). سپس آنزیم تخلیص شده جهت حذف اوره و ایمیدازول در بافر ۵۰ میلی مولار تریس pH 8 دیالیز شد. به دلیل وجود Zn در ساختار آنزیم در بافر دیالیز حدود 0/5 میلی مولار $ZnCl_2$ نیز استفاده گردید و خصوصیات بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

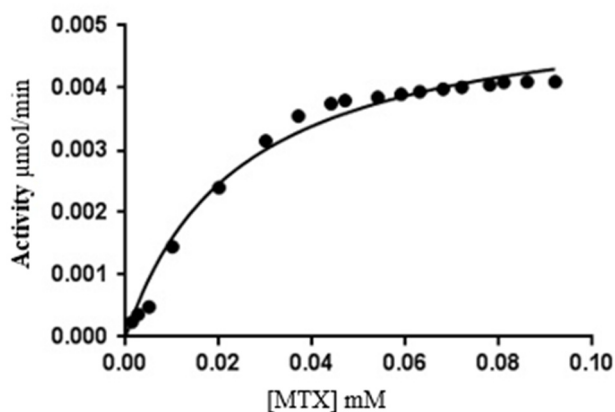
خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم: جهت به دست آوردن pH بهینه آنزیم توسط سوبسترای متوتروکسات در pH های بین ۳ تا ۹ اندازه گیری شد. pH بهینه برای اکسیداسیون متوتروکسات ۷ تعیین گردید. نمودار فعالیت - pH برای این آنزیم در شکل ۴ نشان شده

گراد به مدت ۶ ساعت تعیین شد.

تخلیص آنزیم کربوکسی پپتیداز G2: پس از بیان در شرایط بهینه، مایع رویی سلول های سانتیفریوژ شده حاصل از محیط کشت دور ریخته شد و رسوب آن که حاوی سلول ها و پروتئین مورد نظر بود در بافر تریس ۴۰ میلی مولار pH ۸ حاوی ۳۰۰ میلی مولار NaCl و ایمیدازول ۵ میلی مولار محلول و بر روی یخ sonicate شد. سلول های شکسته شده با سانتیفریوژ با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد ته نشین شدند. محلول رویی و رسوب سلولی بر روی SDS-PAGE برده شد. همانطور که مشاهده می شود هم در محلول رویی و هم رسوب پروتئین وجود دارد. در این مطالعه آنزیم موجود در محلول رویی استفاده گردید. در مرحله بعد، تخلیص مایع رویی حاوی پروتئین نو ترکیب توسط ستون تمایلی نیکل با استفاده از گرادیان ایمیدازول به ترتیب در غلظت های ۶۰ میلی مولار، ۱۰۰ میلی مولار و ۲۵۰ میلی مولار انجام گرفت. در مرحله ی اول خالص سازی بطور کامل انجام نشد و پروتئین مورد نظر در غلظت های پایین ایمیدازول از ستون خارج گردید. برای حل این مسئله در دسترس نبودن، پروتئین برای اتصال به ستون نیکل سفارز مورد بررسی قرار گرفت با توجه به اینکه هر دو انتهای N و



شکل ۴- تعیین pH بهینه- دمای بهینه الف) نمودار فعالیت- pH برای سوبسترای متوتروکسات در دمای محیط. و در مخلوط بافری حاوی تریس، سدیم فسفات، اسید سیتریک و گلايسين ۵۰ mM- در دامنه pH ۳-۹ مورد سنجش قرار گرفت. **ب)** نمودار فعالیت- دما برای سوبسترای - متوتروکسات در مخلوط بافری حاوی پتاسیم فسفات ۵۰mM



شکل ۵- نمودار میکایلیمس منتن - فعالیت کربوکسی پپتیداز G2 در حضور غلظت‌های مختلف متوتروکسات در بافر حاوی پتاسیم فسفات ۵۰mM در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

است. برای سوبسترای متوتروکسات دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه تعیین گردید. دامنه ۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت. پارامترهای سینتیکی آنزیم کربوکسی پپتیداز G2: ۱۵

جدول ۱- خلاصه‌ای از خصوصیات کاتالیتیکی آنزیم تولیدی در آزمایشگاه آنزیم شناسی

حالات	T(optimum)	pH(optimum)	Specific activity ($\mu\text{mol/min/mg}$)	Km(μM)	Vmax($\mu\text{mol/min}$)	شاخص
محلول	۲۵ °C	۷	۰/۱۹۷±۰/۰۰۹۸	۲۴±۱/۲	۰/۰۰۵۴۳۱±۰/۰۰۰۲	CPG2

اکسیداسیون متوتروکسات (۰/۳۴ میلی‌مولار) در بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار) با کاهش جذب در nm ۳۲۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. پارامترهای سینتیکی آنزیم ($V_{\max}$ و K_m) با استفاده از رابطه میکائلیس-منتن است و توسط برنامه Prism، به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین‌های درمانی دارای مزیت‌های بسیاری نسبت به داروهای کوچک مولکول هستند، فعالیت اختصاصی آن‌ها را هیچ داروی کوچک مولکولی نمی‌تواند تقلید کند. همچنین به دلیل همین فعالیت اختصاصی، امکان تداخل با فرآیندهای بیولوژیکی نرمال بدن و ایجاد عوارض جانبی کاهش می‌یابد. علاوه بر این از آنجایی که بعضی از این پروتئین‌ها از پروتئین‌های طبیعی بدن هستند احتمال ایجاد پاسخ ایمنی نامطلوب نیز کاهش می‌یابد. از منظر اقتصادی نیز مدت زمان لازم برای گرفتن تأییدیه سازمان‌های غذا و دارو نسبت به داروهای کوچک مولکول کمتر است و همچنین به دلیل یکتایی پروتئین‌های مختلف در ساختار و عمل، ثبت پتنت برای تولید پروتئین آسان‌تر است و به همین دلیل توجه بسیاری از شرکت‌های دارویی به تولید داروهای پروتئینی معطوف شده است. از طرف دیگر با توجه به ماهیت کاتالیتیک آنزیم‌ها در صورت استفاده از آنها به عنوان دارو می‌توان انتظار داشت که بتوانند تعداد زیادی از مولکولهای هدف را به محصول دلخواه تبدیل کنند. آنزیم‌های دارویی در درمان بیماری‌های عفونی، درمان بافتهای آسیب دیده و درمان سرطان نقش مهمی ایفا میکنند. پیشرفت در بیوتکنولوژی در طی ده سال گذشته به شرکت‌های داروسازی این اجازه را داده است که محصولات آنزیمی ایمن تر، ارزان تر با توانایی و اختصاصیت افزایش یافته را تولید کنند. توسعه و تولید پروتئین‌های درمانی نشان دهنده‌ی اولین کاربرد صنعتی تکنولوژی DNA نو ترکیب بود. در آغاز انقلاب بیوتکنولوژی هدف اصلی بیان و تولید کارآمد

پروتئین نو ترکیب بود. پیشرفت‌ها در علوم پروتئین، ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی فرصت‌های جدیدی را برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب جهت رویارویی با مدیریت بهتر بیمار و اختصاصیت فعالیت دارویی فراهم نموده است. نوآوری در صنعت داروسازی وابسته به تولید و طراحی داروهای جدید و ایمن با در نظر گرفتن عملکرد و مقرون به صرفه بودن آنها است. بیوتکنولوژی و علوم ژنتیکی در فرایندهای توسعه‌دهی دارویی به شرکت‌های داروسازی این امکان را می‌دهد که برای هر دارو حدود ۳۰۰ میلیون دلار در حدود یک سوم هزینه‌های امروزه صرفه جویی کنند و این چشم انداز را دارد که داروها یک یا دو سال زودتر به بازار وارد شوند. لذا جهت دستیابی به اهداف مطرح در نقشه جامع علمی کشور، سند ملی توسعه زیست فناوری در برخورداری از ۳ درصد بازار جهانی محصولات زیست فناوری و کمک به ارتقای سطح علمی و فناوری به منظور کسب مقام نخست منطقه و سهم شایسته جهانی، با توجه به اهمیت توسعه صادرات محصولات زیستی و لزوم تحقق هدف کمی مندرج در نقشه جامع علمی کشور در این حوزه، لزوم تدوین نقشه راه و انجام مطالعات مرتبط در حوزه‌های مختلف زیست‌فناوری در بررسی وضعیت موجود بازار زیست‌فناوری و پیش بینی میزان صادرات هر حوزه تا افق ۱۴۰۴ بیش از پیش آشکار می‌شود. لذا براساس نقش ذاتی این امر در دانشگاه‌ها و مراکز علمی و تحقیقاتی در جهت تولید آزمایشگاهی محصولات دارویی نو ترکیب، بر آن شدیم تا با استفاده از توان تکنیکی و علمی لازم قدم در مسیر رفع نیازهای داخلی کشور در زمینه تولید داروهای نو ترکیب و نادر براساس اولویت‌های ذکر شده توسط مراجع ذیصلاح امر از جمله وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، انجمن بیوتکنولوژی، ستاد توسعه زیست فناوری و شبکه بیوتکنولوژی پزشکی کشور نهاده و داروی نو ترکیب و نادر کربوکسی پپتیداز G2 با نام تجاری وراکساز (Voraxaze) را که در سال ۲۰۱۲ توسط FDA تایید شده است و به عنوان یکی از

گرفت. با مطالعه نتایج حاصل از بیان مشخص شد که آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهتر از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیان می‌شود و همچنین تغییر زمان و تغییر غلظت IPTG بالاتر از ۰/۵ میلی‌مولار و ۶ ساعت زمان، تأثیری در افزایش بیان آنزیم ندارد. لذا بهترین شرایط بیان آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 شامل دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG و زمان ۶ ساعت به دست آمد. که تحت این شرایط بیانی بصورت ۵۰٪ به فرم محلول و ۵۰٪ به صورت اینکلوژن بادی و نامحلول به دست آمد که نسبت به نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی بر روی این آنزیم این نتیجه قابل قبولی بوده است.

از آنجایی که این پروتئین دارای قیمت بالا (هر ویال 1ml آن حدود ۲۷ هزار دلار) و از داروهای بیوسیمیلار است، که در اولویت های وزارت بهداشت برای تولید در کشور می‌باشد و به دست آمدن فرم محلول و فعال در داخل سلول دستاورد بزرگی است که در آینده بتوان از آن برای تهیه این پروتئین دارویی در مقیاس صنعتی بهره برد، تا بتواند بصورت یک داروی نو ترکیب به راحتی در دسترس عموم قرار بگیرد. ضمن اینکه باعث کاهش هزینه های درمانی و تسریع روند بهبودی بیماران گردد و کمکی به بومی سازی علوم در کشور شود. در این پژوهش پس از سنتز ژن آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 مراحل کلونینگ، بیان، تخلیص و خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم مذکور بررسی شد و نتایج رضایت بخشی حاصل گردید. این پروتئین نو ترکیب بصورت محلول و فعال در داخل سلول باکتری تولید شده و امید است که در آینده به توسعه صنعتی برسد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از دانشگاه تربیت مدرس و موسسه نیماد که با همکاری صمیمانه خود ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند ابراز می‌دارند.

References

1. Widemann BC, Sung E, Anderson L, et al. Pharmacokinetics and metabolism of the methotrexate metabolite 2, 4-diamino-N(10)-methylpteroic acid. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294:894-901.

داروهای نادر مورد نیاز کشور که در اولویت های وزارت بهداشت به عنوان داروی بیوسیمیلار با قیمت بالا می‌باشد را مورد مطالعه قرار دهیم هدف اصلی این پژوهش تولید آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 نو ترکیب بود. برای این منظور پس از سنتز ژن آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 مراحل کلونینگ، بیان، تخلیص و خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از مسائلی که در تولید این دارو به عنوان یک داروی پروتئینی اهمیت بسیار زیاد دارد تخلیص آن از مجموعه پروتئینی سلول میزبان تولید کننده آن می‌باشد همچنین در این پروژه پروتئین به دست آمده بصورت ۵۰٪ محلول و ۵۰٪ بصورت اینکلوژن به دست آمد به همین دلیل جهت محلول کردن کامل این پروتئین و به دست آوردن پروتئین کاملاً محلول و فعال تحقیقات و مطالعاتی در حال انجام است.

در تحقیق اولیه که بروی این آنزیم در سال ۱۹۸۴ توسط Sherwood و همکارانش صورت گرفت آنزیم مورد مطالعه از دو سویه سودوموناسی و *E.coli* به دست آمده بود و این مطالعه جهت بررسی و مقایسه آنزیم به دست آمده از دو منبع متفاوت بود که با وجود اینکه از آنزیم سیستم بیانی سودوموناسی فعالیت قابل قبولی مشاهده شد ولی میزان بیان و فعالیت مشاهده شده کمتر از سیستم بیانی *E.coli* بود (۹). به همین دلیل پس از آن در مطالعه بعدی توسط گودا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی این آنزیم انجام شد برای بیان این پروتئین از سیستم بیانی *E.coli* برای بیان آن استفاده شد که پروتئین به دست آمده به فرم اینکلوژن بادی و نامحلول بود و بررسی های آنزیمی پس از Refolding پروتئین بروی آن انجام گردید (۱۰). در تحقیقی که در این اواخر صورت گرفته به بررسی دمین های این پروتئین پرداخته است، و اثر حذف این دمین ها در میزان بیان پروتئین و به دست آمدن فرم محلول پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۳).

ولی بطور کلی می‌توان گفت بررسی بر روی این پروتئین ارزشمند و با قیمت بالا در کشور برای اولین بار صورت گرفته است. کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز G2 با استفاده از سویه *E. coli* BL21 صورت گرفت. سپس بهترین دما و شرایط القا و زمان مناسب باکتری نو ترکیب بیانی در شرایط مختلف مورد بررسی قرار

2. Monahan BP, Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner BA, Longo DL, editors. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.
3. Phillips M, Smith W, Balan G, Ward S. Pharmacokinetics of glucarpidase in subjects with normal and impaired renal function. J Clin Pharmacol. 2008;48:279–284.
4. Binscheck T, Ambach L, Grobosch T, Schwartz S. Glucarpidase – a fast and efficient antidote in methotrexate poisoning. Clin Toxicol. 2010;48:299.
5. Voraxaze® (glucarpidase, full prescribing information) West Conshohocken, PA: BTG International Inc; 2012.
6. Buchen S, Ngampolo D, Melton RG, et al. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. Br J Cancer. 2005;92:480–487.
7. Minton NP, Atkinson T, Sherwood RF. Molecular cloning of the *Pseudomonas* carboxypeptidase G2 gene and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. J Bacteriol. 1983;156:1222–1227.
8. Sherwood RF, Melton RG, Alwan SM, Hughes P. Purification and properties of carboxypeptidase G2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16. Use of a novel triazine dye affinity method. Eur J Biochem. 1985;148:447–453.
9. Goda SK, Baoumi Rashidi FA, Fakhro AA, Al-obaidli A. Functional Overexpression and Purification of a Codon Optimized Synthetic Glucarpidase (Carboxypeptidase G2) in *Escherichia coli*. Protein J. 2009;28:435–42.
10. Rowsell S, Pauptit RA, Tucker AD, Melton RG, Blow OM, Brick P. Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. Structure. 1997;5:337–347.
11. Jeyaharan D, Aston Ph, Garcia-Perez A, Schouten J, Davis P, Dixon AM. Soluble expression, purification and functional characterisation of carboxypeptidase G2 and its individual domains. Protein Express Pur. 2016;127:44e52.
12. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nature Rev Drug Discov. 2008;7(1): 21–39.
13. Reichert J.M., Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. Nature Rev Drug Discov. 2003;2(9): 695–702.