مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

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

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: ACY05517) 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 نوترکیب به داخل سویه بیانی *E. coli* BL21 ترنسفورم شد و تعدادی از پلاسمیدهای تایید شده از طریق Colony PCR برای تعیین توالی با پرایمر T7 promotor 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 ویژگی های سینتیکی آن بررسی شد. pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۷ و ۲۵°C به دست آمد. برای سوبسترای متوتروکسات K_m= ۲۴ µM و V_{max} = ۰/۰۰۵۴۳۱ µmol/min محاسبه شد.

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

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

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

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۰

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 به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(10):8-18. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

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 Scinces, Tarbit Modares University, Tehran, Iran
Nasrin Kardani, MSc, Biochemistry Department, Faculty of Biological Scinces, Tarbit Modares University, Tehran, Iran
Atefeh Khodakarami, MSc, Biochemistry Department, Faculty of Biological Scinces, Tarbit Modares University, Tehran, Iran
Khosro Khajeh, Professor, Biochemistry Department, Faculty of Biological Scinces, Tarbit Modares University, Tehran, Iran
Bahareh Dabirmanesh, Assistant Professor, Biochemistry Department, Faculty of Biological Scinces, 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 synthetized 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 µM and 0.005431 µmol/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 G_2

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

مقدمه

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 آرترایتیسم، مولتیپل اسکلروزیز 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 روماتویید و مواقعی که با لوکوورین ترکیب می‌شود تا دوزهای ۳۳۰۰۰۰-۱۰۰۰ mg/ml. در دوزهای ۳۳۰۰۰۰-۱۰۰۰ mg/ml که اصطلاحاً متوترکسات دز بالا گفته می‌شود (۳). معمولاً به‌عنوان یک تزریق بلندمدت تجویز می‌شود که در بیماران با عملکرد کلیوی نرمال از طریق مصرف بیش‌ازحد 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 (۵ و۴). گلوکارپیداز یا کربوکسی پپتیداز G2 متالوآنزیم باکتریایی سودوموناس از سویه RS-16، پروتئین همودایمری با وزن مولکولی ۴۱۸۰۰× ۲ 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 ۵- فورمیل تتراهیدروفولات -2,4 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 هموژن 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 (۸و۷). 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 ۲و۴ دی آمینو-N10- متیل پتروئیک اسید (DMAP) متابولیزه کرده و روش دیگری را برای دفع کلیوی متوتروکسات مهیا می‌سازد (۱۰ و ۹). 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

حدود ۲۷،۰۰۰ دلار در آمریکا به فروش می‌رسد. قابل ذکر است که مقدار مصرف در هر بار استفاده ۵۰ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار می‌باشد. یعنی هزینه تنها یک بار استفاده از دارو در مورد یک بیمار با وزن ۷۰ کیلوگرم بدون در نظر گرفتن هزینه‌های واردات، در حدود ۹۳،۸۰۰ دلار برآورد می‌شود (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

آنزیم‌های مورد نیاز (پلیمراز، محدودگر Nde1 و Xho1 و)... (FermentaseCo.) و EDTA، SDS (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* ترنسفرم می‌شد. با توجه به ارجحیت کدونی باکتری *E.coli* ژن کربوکسی پپتیداز G2توسط شرکت GeneCust بهینه شد، و سپس سنتز ژن در بین دو سایت برش NdeI وXhoI توسط این شرکت در وکتور pUC57 انجام گردید. از آنجا که برای ادامه روند کار باید ژن در داخل وکتور pET28 کلون می‌شد با کمک نرم‌افزار 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 نوترکیب و بعد از ترنسفورم کردن آن در سلول‌های *E.coli* BL21، سلول‌های ترنسفورم شده در محیط کشت LB آگار(جامد) واجد آمپی‌سیلین ۱۰۰mg/ml، کاناماسین 50 mg/ml و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند از کلونی‌های رشد کرده روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، یک پلیت مادر تهیه شد. با استفاده از پرایمرهایی که برای تکثیر قطعه ژنی استفاده شدند، PCR Colony بر روی تعدادی از کلونی‌ها انجام شد. از کلونی‌هایی 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 روش‌ها برای تعیین توالی با پرایمر T7 promotor و T7 terminator، ارسال شدند.

بیان پروتئین: ابتدا تک کلنی از باکتری حاوی وکتور نوترکیب مورد نظر، در حجم mL ۱۰ محیط کشت LB مایع حاوی کاناماسین $50\mu g\ mL^{-1}$ به مدت ۱۶ساعت کشت داده شد .سپس به نسبت ۱:۱۰۰در mL ۱۰۰ محیط کشت جدید تلقیح شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ °C با دور ۲۰۰ rpm منتقل شد و بعد از رسیدن به ODبرابر ۰/۵ غلظتهای مختلف IPTG (۰/۲۵، ۰/۵، ۱) دما (۲۵ و۳۷) و زمانهای متفاوت (۲، ۴، ۶ و ۱۰ ساعت) بررسی گردید. بیان بهینه در با غلظت نهائی غلظت۰/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶ساعت تعیین شد. سلول‌ها پس از ۶ ساعت انکوباسیون با سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند (min, ۴ °C g, ۲۰ ۱۲۰۰۰). در مرحله بعد رسوب به دست آمده در بافر تریس ۴۰ میلی مولار pH ۸ حاوی Nacl ۳۰۰میلی مولار و ایمیدازول ۵ میلی مولار بر روی یخ sonicate شد. این عمل به مدت ۱۰ دقیقه و در هر دقیقه ۲۰ ثانیه سلول‌ها سونیکه می‌شدند و ۴۰ ثانیه روی یخ می‌ماندند. سلول‌های شکسته شده با سانتریفیوژ با دورg ×۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد ته‌نشین شدند. سپس همه نمونه ها به همراه بافر نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند. برای آنالیز بیان پروتئین نوترکیب 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

از ستون نیکل سفارز (Nickel - Sepharose) استفاده شد .آنزیم نوترکیب بیان شده دارای دنبالهٔ هیستیدینی (His_6-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 میلی‌مولار ایمیدازول و ۳۰۰میلی مولار نمک NaClبه تعادل رسید. سپس عصاره ی 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 ۴۰میلی‌مولار به همراه ایمیدازول ۲۵۰میلی‌مولار و نمک NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار 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 ۱۲درصد SDS-PAGE بر طبق روش Laemmli کنترل شد.

تعیین فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز در دمای اتاق در حضور سوبسترای اصلی این آنزیم متوتروکسات به روش سینتیکی مورد بررسی قرار گرفت. در مخلوط آزمایش، اکسیداسیون متوتروکسات ۳۴میلی‌مولار در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۸ pHبا کاهش جذب در ۳۲۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد (ε= 8300M^{-1} cm^{-1}).

تعیین pH بهینه آنزیم برای سوبسترای متوتروکسات: به منظور یافتن pH بهینه، فعالیت آنزیم در مخلوط پلی بافری حاوی تریس۵۰ میلی‌مولار، سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار، سیتریک اسید ۵۰ میلی‌مولار و گلایسین ۵۰میلی‌مولار با استفاده از سوبسترای متوتروکسات در دامنه pH (۹-۳) مورد سنجش قرار گرفت.

تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم: به منظور یافتن دمای بهینه، فعالیت آنزیم در مخلوط بافری حاوی پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با استفاده از سوبسترای متوتروکسات در دامنه ی دمایی ۵۵-۵ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت.

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

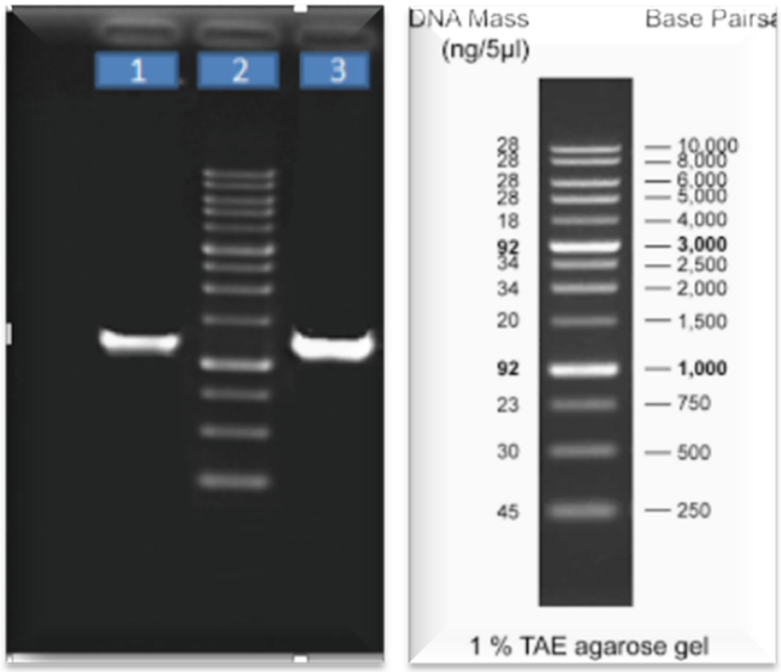
یافته‌ها

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 *Ecoli* 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 محدود کننده 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 محدود کننده 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.

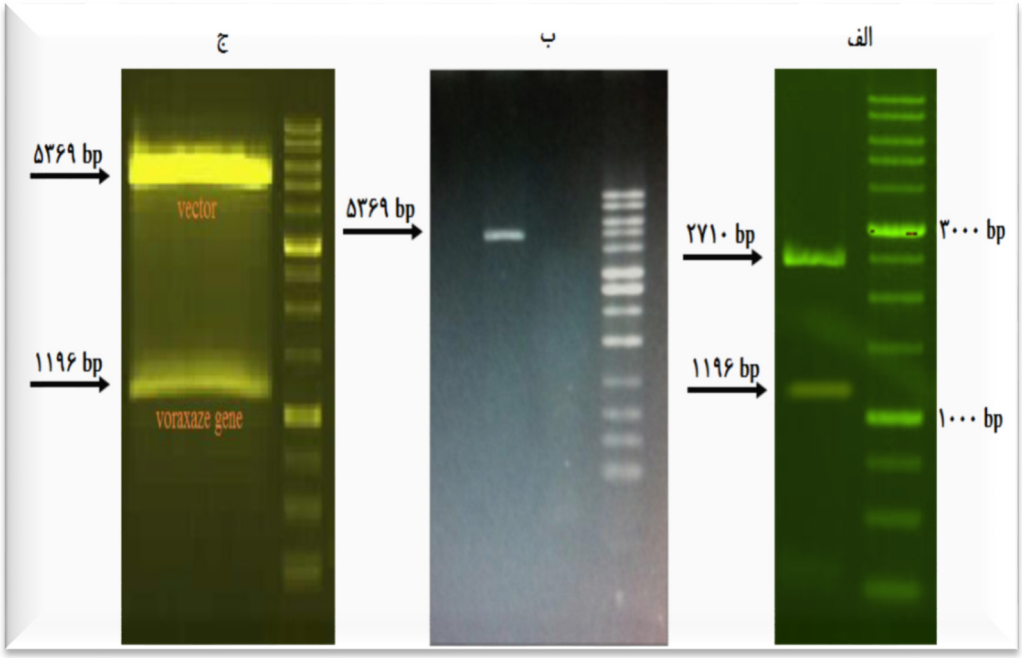
قطعه ژنی مورد نظر حاصل از هضم پلاسمید pUC57 و محصول حاصل از هضم pET28a پس از استخراج از ژل برای انجام واکنش الحاق بکار برده شدند. سپس محصولات حاصل از الحاق به باکتری *E. coli* BL21 انتقال پیدا کرد. از سویه‌های مثبت پلاسمید استخراج شد. هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب pET28a با آنزیمهای NdeI و XhoI برای تایید وارد شدن ژن مورد نظر به وکتورpET28a 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]



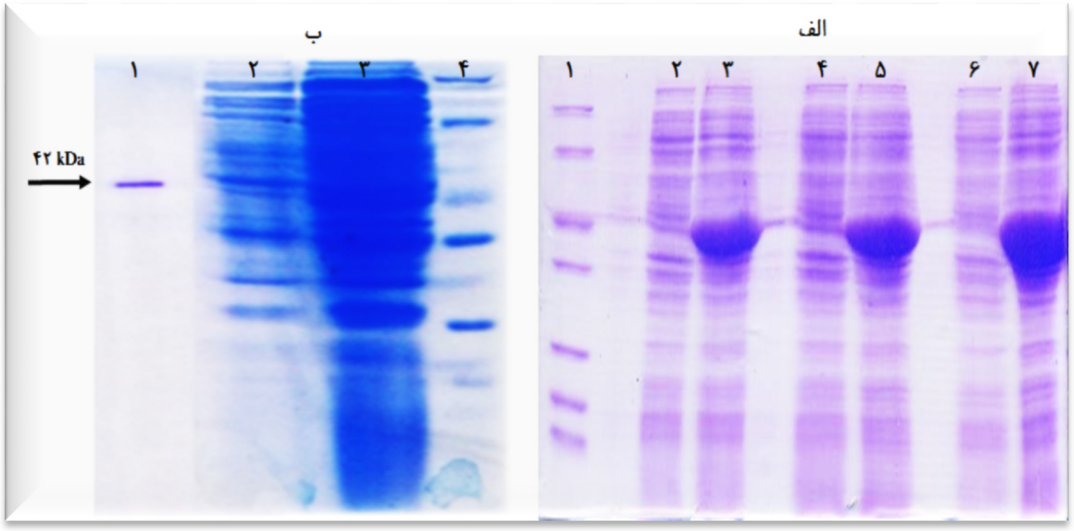
شکل ۱– نمونه ۱: نمونه PCRبر روی ژن اولیه سنتز شده، نمونه ۲: DNA ladder، نمونه ۳: نمونه PCR برروی ژن کلون شده.



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 محدود کننده NdeI و XhoI ج) ژل فرایند هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودکننده NdeI و Xho I پلاسمید خطی شده در ناحیه بین ۵۰۰۰ bp مشخص است.

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 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 غلظت۰/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]



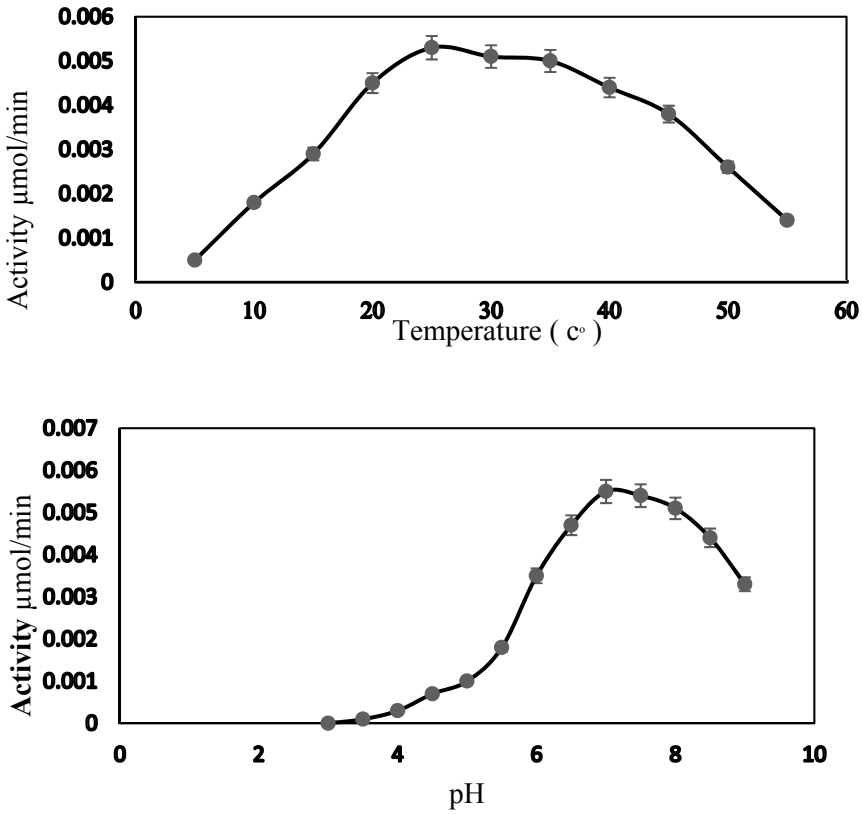
شکل ۳- الف)آنالیز بیان پروتئین کربوکسی پپتیداز G2(۱: پروتئین مارکر – ۲:قبل القا زمان ۲ ساعت – ۳:بعد القا زمان ۲ساعت –۴: قبل القا زمان ۴ ساعت–۵: بعد القا زمان ۴ ساعت – ۶:قبل القا زمان ۶ ساعت – ۷:بعد القا زمان ۶ساعت). نمونه از ژل های الکتروفورز در زمانه های مختلف، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و غلظت ۰/۵ میلی‌مولار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

گراد به مدت ۶ ساعت تعیین شد.

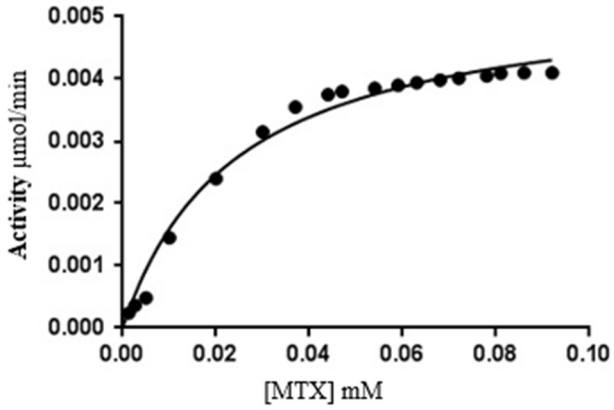
تخلیص آنزیم کربوکسی پپتیداز G2: پس از بیان در شرایط بهینه، مایع رویی سلول‌های سانتریفیوژ شده حاصل از محیط کشت دور ریخته شد و رسوب آن که حاوی سلول‌ها و پروتئین مورد نظر بود در بافر تریس ۴۰ میلی‌مولار pH ۸ حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و ایمیدازول ۵ میلی مولار محلول و بر روی یخ sonicate شد. سلول‌های شکسته شده با سانتریفیوژ 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 می‌شود 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 نوترکیب 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 سفاروز مورد بررسی قرار گرفت با توجه به اینکه هر دو انتهای N و 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 کاملا 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 تریس8 pH 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 pHهای 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]



شکل۴- 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 گلایسین mM ۵۰- 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 میکایلیس منتن - فعالیت کربوکسی پپتیداز G2 در حضور غلظت‌های مختلف متوتروکسات در بافرحاوی پتاسیم فسفات ۵۰mM در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

است.

دمای بهینه با استفاده از سوبسترای متوتروکسات در دامنه ۵۵-۵ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت. برای سوبسترای متوتروکسات دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه تعیین گردید.

پارامترهای سینتیکی آنزیم کربوکسی پپتیداز G2:

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

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

حلالیت	T(optimum)	pH(optimum)	activity Specific (µmol/min/mg)	Km(µM)	Vmax(µmol/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 (K_m و V_{max}) 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 ازآنجایی‌که 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 بیمارهای عفونی، درمان بافتهای آسیب دیده و درمان سرطان نقش مهمی ایفا میکنند. پیشرفت در بیوتکنولوژی در طی ده سال گذشته به شرکت های داروسازی این اجازه را داده است که محصولات آنزیمی ایمن تر، ارزان تر با توانایی و اختصاصیت افزایش یافته را تولیدکنند. توسعه و تولید پروتئین‌های درمانی نشان دهنده‌ی اولین کاربرد صنعتی تکنولوژی DNA نوترکیب بود. در آغاز انقلاب بیوتکنولوژی هدف اصلی بیان و تولید کارآمد پروتئین نوترکیب بود. پیشرفت‌ها در علوم پروتئین، ژنتیک و زیست شناسی مولکولی فرصت های جدیدی را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب 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 شرکت های داروسازی این امکان را می دهد 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 می شود. لذا براساس نقش ذاتی این امر در دانشگاه ها و مراکز علمی و تحقیقاتی در جهت تولید آزمایشگاهی محصولات دارویی نوترکیب، بر آن شدیم تا با استفاده از توان تکنیکی و علمی لازم قدم در مسیر رفع نیازهای داخلی کشور در زمینه تولید داروهای نوترکیب 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 نوترکیب و نادرکربوکسی پپتیداز G2 با نام تجاری وراکساز (Voraxaze) را که در سال ۲۰۱۲ توسط FDA تایید شده است و به عنوان یکی از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

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 نوترکیب 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 مسایلی 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٪ سصورت اینکلوژن به دست آمد به همین دلیل جهت محلول کردن کامل این پروتئین و به دست آوردن پروتئین کاملا محلول و فعال تحقیقات و مطالعاتی در حال انجام است.

در تحقیق اولیه که بروی این آنزیم در سال۱۹۸۴ 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(9). 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 شدکه پروتئین به دست آمده به فرم اینکلوژن بادی و نامحلول بود و بررسی‌های 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 صورت‌گرفت. سپس بهترین دما و شرایط القا و زمان مناسب باکتری نوترکیب بیانی در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. با مطالعه نتایج حاصل از بیان مشخص شد که آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهتر از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیان می شود و همچنین تغییر زمان و تغییر غلظت IPTG بالاتر از ۰/۵ میلی مولار و ۶ ساعت زمان، تأثیری در افزایش بیان آنزیم ندارد. لذا بهترین شرایط بیان آنزیم کربوکسی پپتیداز G2 شامل دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، غلظت۰/۵ 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 برروی این آنزیم این نتیجه قابل قبولی بوده است.

ازآنجایی‌که 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 نوترکیب 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 نوترکیب 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 صمیمانهٔ 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]

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, Fakharo 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 Expres 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. 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-04-10]