



Expression, Purification, and Stability Study of Uricase in *Escherichia coli*

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Daneshjoo S.^{*1} PhD,
Dashtban Moghadam E.S.² PhD,
Jaafari M.R.³ PhD,
Rezayat sorkhabadi S.M.⁴ PhD,
Khajeh Kh.^{*2} PhD

How to cite this article

Daneshjoo S, Dashtban Moghadam E.S, Jaafari M.R, Rezayat sorkhabadi S.M, Khajeh Kh. Expression, Purification, and Stability Study of Uricase in *Escherichia coli*. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 305-311.

¹Medical Nanotechnology Department, Advanced Science & Technology Faculty, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Nanotechnology Research Center, Pharmacy Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴Medical Nanotechnology Department, Advanced Technologies in Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884717

Fax: +98 (21) 82884717

khajeh_k@yahoo.com

Article History

Received: August 22, 2017

Accepted: October 28, 2017

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Some diseases such as gout, the formation of kidney stones, Lesch-Nyhan syndrome, Heart disease, diabetes type II and metabolic syndrome are caused due to the high concentration of uric acid. Within drugs, uricase significantly decreases the level of uric acid in plasma. The production, formulation and preservation proteins need special conditions so that there was no alteration in their structure and highest activity and response, at the same time the lowest immunogenicity can be achieved. In this study, uricase from *Aspergillus flavus* was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21. The protein was then purified using affinity chromatography. The enzyme activity and stability were compared with the common industrial Rasburicase. Results showed higher activity and stability at different temperatures (50, 37, 25, 4, and -20°C). Since uricase has an important role in the prevention and cure of mentioned diseases, therefore, the stable form of this enzyme could be a potential candidate for drug development.

Keywords Uricase; Rasburicase; Gout; Uric Acid; Thermal Stability

CITATION LINKS

[1] Improving the in vitro stability of proteins by PEGylation [Dissertation] [2] Pharma 2010: The threshold of innovation [Internet] [3] Handbook of modern pharmaceutical analysis [4] Stability of protein pharmaceuticals: An update [5] Protein drug stability: A formulation challenge [6] Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis [7] Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene [8] Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice [9] Improved performance of polyaniline-uricase biosensor [10] Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimido-styrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor [11] Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: a reassignment of the active-site binding mode [12] Rasburicase (Recombinant Urate Oxidase) for the Management of Hyperuricemia in Patients with Cancer: Report of an international compassionate use study [13] Rasburicase: a potent uricolytic agent [14] Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: results of a compassionate-use trial [15] High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli* [16] Enzymatic determination of uric acid in serum with the trinder reaction (author's transl) [17] A rapid and sensitive method for the quantization of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [18] Degradation of low molecular weight uremic solutes by oral delivery of encapsulated enzyme [19] In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricase-albumin polymers: A model for enzyme therapy [20] Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes [21] Biochemical and biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol [22] PEGylation: Posttranslational bioengineering of protein biotherapeutics [23] Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles [24] Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles

بیان، تخلیص و پایداری آنزیم اوریکاز در باکتری *اشریشیا کلی*

سمیه دانشجو PhD

گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

الهه سادات دشتیان مقدم PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محمودرضا جعفری PhD

مرکز تحقیقات نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

سیدمهدی رضایت PhD

گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران

خسرو خواجه PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

به دنبال غلظت بالای اوریک اسید، بیماری هایی مانند نقرس (التهاب مفاصل)، شکل گیری سنگ های کلیوی، سندرم لیش- نیهان، بیماری های قلبی، دیابت تیپ ۲ و سندرم های متابولیک ایجاد می شود. از جمله داروهایی که موجب کاهش سطح آن در پلاسما می شود آنزیم اوریکاز است. تولید، فرمولاسیون و نگهداری پروتئین ها نیاز به توجه خاصی دارد تا ساختار آن تغییر نکند و بیشترین میزان فعالیت و پاسخ و کمترین میزان حساسیت زایی به دست آید، در این مطالعه، آنزیم اوریکاز پس از کلون، ترانسفورم، بیان در باکتری *اشریشیا کلی* و تخلیص توسط کروماتوگرافی تمایلی، در مقایسه با نمونه رایج دارویی آنزیم Rasburicase فعالیت بالاتری داشته و نیز در همه دماهای مورد مطالعه پایداری حرارتی (۵۰، ۳۷، ۲۵، ۴ و -20°C)، آنزیم اوریکاز نوترکیب دارای مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم رایج دارویی است. حال با توجه به نتایج به دست آمده و همچنین اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری، درمان و قیمت بالای این داروی وارداتی، توسعه اشکال پایدار این آنزیم میتواند به عنوان مصارف دارویی مد نظر قرار گیرد.

کلیدواژه ها: اوریکاز، Rasburicase، نقرس، اسید اوریک، پایداری حرارتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۶

* نویسنده مسئول: khajeh_k@yahoo.com

مقدمه

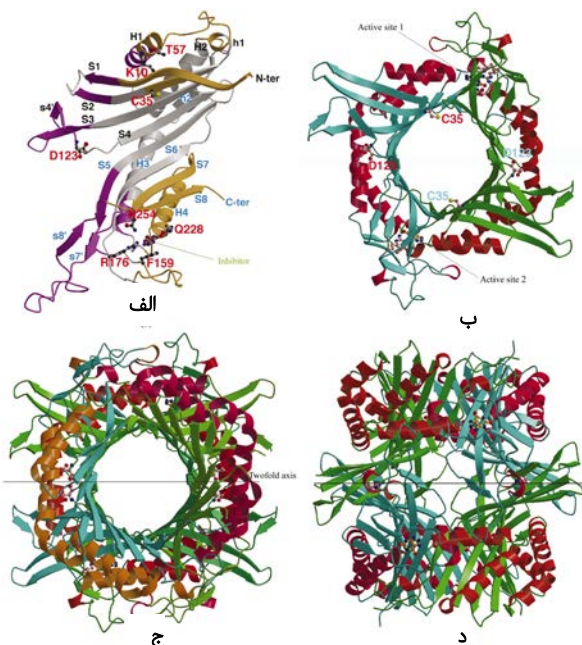
پروتئین ها به عنوان دسته مهمی از داروها در درمان، بهبود یا جلوگیری از بیماری ها کاربرد دارند. این داروهای پروتئینی با استفاده از تکنولوژی های نوترکیب و انتقال ژنتیکی تولید می شوند [1]. بسیاری از داروهای جدید بر پایه فناوری های زیستی و استفاده از پروتئین ها بنا نهاده شده اند. دلیل استقبال عمومی به این داروها را می توان به سمیت اندک و رفتار "درون تنی" (In Vivo) قابل پیش بینی مرتبط دانست. از سوی دیگر داروهای نوترکیب با سرعت بیشتری از داروهای قدیمی و شیمیایی وارد بازار دارویی می شوند [2]. در مقایسه با مولکول های کوچک، پروتئین ها از لحاظ ساختاری پیچیدگی زیادی دارند. از دیگر خصوصیات قابل توجه داروهای پروتئینی جرم مولکولی بالای این داروها است [3]. علی رغم مزایای عنوان شده در مورد داروهای پروتئینی، این فرآورده های دارویی واجد مشکلاتی از قبیل ناپایداری ذاتی و نیمه عمر اندک بوده و نیز مستعد تخریب آنزیماتیک هستند [4]. از سوی دیگر به منظور توسعه داروهای پروتئینی، محققین دارویی با مشکلات زیادی روبه رو هستند. موفقیت یک داروی پروتئینی در درمان به عوامل مختلفی از قبیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مشخص، پایداری فیزیکی و شیمیایی،

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

خاصیت ایمنی زایی و خصوصیات فارماکوکینتیکی مطلوب بستگی دارد [5].

به طور کلی می توان ناپایداری های پروتئینی را به دو دسته کلی ناپایداری های فیزیکی و ناپایداری های شیمیایی تقسیم بندی نمود [4, 6]. از مهم ترین عوامل ناپایداری فیزیکی پروتئین ها می توان به دنا تورا سیون، جذب سطحی، تجمع و رسوب اشاره نمود. بنابراین بررسی ناپایداری آنزیم های دارویی و به کارگیری راهبردهایی برای پایداری سازی آنها اهمیت فراوانی دارد.

آنزیم دارویی اورات اکسیداز یا اوریکاز آنزیمی پراکسی زومی است و در اکثر مهره داران اکسیداسیون اوریک اسید به آلانتوئین را کاتالیز می کند. آلانتوئین یک متابولیت غیرفعال متابولیزم پورین ها است و ۵ تا ۱۰ برابر از اسید اوریک محلول تر است. بنابراین دفع آن از طریق کلیه بهر صورت می گیرد [7]. اسید اوریک در خون اکثراً به صورت نمک تک سدیمی یا به صورت آزاد است که در هر دو صورت نامحلول است و تجمع غیرمعمول آن در بدن معمولاً به صورت هایپراورسمیا بروز می کند. به دنبال غلظت بالای اوریک اسید بیماری هایی چون بیماری نقرس (التهاب مفاصل)، شکل گیری سنگ های کلیوی، سندرم لیش نیهان، دیابت تیپ ۲ و سندرم های متابولیک ایجاد می شود [8]. داروهایی که موجب کاهش سطح آن در پلاسما می شوند شامل الوپورینول، ایموران، کلوفیبرات، کورتیکواستروئیدها، استروژن ها، دیورتیک ها، انفوزیون های گلوکز، گایفنزین، وارفارین و آنزیم اوریکاز هستند که با توجه به کیفیت بالا و تدارکات کم هزینه آنزیم های میکروبی، استفاده از آنزیم اوریکاز عملی و رایج شده است. این آنزیم از سویه های میکروبی مانند میکروکوکوس، بروی باکتریوم، استرپتومیسس، کاندیدا، باسیلوس، سودوموناس، آرتروباکتر و اسپرزیلوس جدا شده است [9-10] (شکل ۱).



شکل ۱ (الف) توپولوژی آنزیم اورات اکسیداز (ب) مونومر آنزیم؛ رزیدوهای درگیر در تترامریزاسیون به رنگ سرخابی و رزیدوهای درگیر در دایمریزاسیون به رنگ طلایی نشان داده شده اند، (ج) و (د) دو نمای قائم از تترامر

اورات اکسیداز یک آنزیم گلوبولار و هموتترامر پایدار در محیط آبی با سایز ۵۰×۵۰ آنگستروم مربع است که تونلی به قطر ۱۲ و طول ۵۰ آنگستروم را در بر گرفته است. هر مونومر ترکیبی از دو دومین است که از نظر ساختاری معادل هم هستند و اصطلاحاً به آن

سونیکاسیون شامل ۱۰ مرحله ۲۰ ثانیه‌ای با فاصله زمانی ۳۰ ثانیه بین هر مرحله بود. به علاوه برای جلوگیری از تخریب گرمایی تمامی مراحل سونیکاسیون در حضور یخ صورت گرفت. سلول‌های لیزشده، در دمای 4°C با $1000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت و میزان بیان پروتئین در سوپ رویی به ترتیب از طریق سنجش فعالیت آنزیمی و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای فعالیت و بیان بالا در این مرحله برای خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

تخلیص و سنجش غلظت پروتئین: تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون نیکل سفارز طی یک مرحله صورت گرفت. در این مطالعه آنزیم‌های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی هستند که این دنباله تمایل زیادی به نیکل داشته و میانکشی محکمی با آن برقرار می‌کند. قبل از انجام تخلیص، ابتدا ستون کروماتوگرافی توسط بافر شست‌وشو یا تعادلی شامل ۵۰ میلی‌مولار تریس، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول با pH ۸ به تعادل رسید. سپس نمونه حاصل از لیز سلولی که دوباره سانتریفیوژ شده به ستون منتقل و به‌طور کامل از ستون عبور داده شد و به دنبال آن ستون توسط بافر شست‌وشو، شسته شد و در آخر برای جداسازی پروتئین متصل به ستون از بافر جداکننده استفاده شد. بافر جداکننده حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۵۰ میلی‌مولار تریس با pH برابر ۸ است. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین مورد نظر و تأثیر پروتئین‌های موجود در محیط، تخلیص در یخ و با استفاده از بافرهای سردشده، صورت گرفت. در نهایت پروتئین تخلیص‌شده جمع‌آوری شد و برای حصول اطمینان از خلوص نمونه‌ها تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE احیایی به کار رفت. پس از اطمینان از خلوص پروتئین (پروتئین تک‌باند روی ژل SDS-PAGE) همه نمونه‌های خالص روی هم ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر از آن در مقابل ۳ لیتر بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس-HCl با pH برابر ۷/۴ به مدت ۱۸ ساعت دیالیز شد.

ژل تغلیظ‌کننده (بالا) با غلظت ۵٪ و ژل جداکننده (پایین) با غلظت ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بریلانت بلو R250 انجام شد. سپس به منظور سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد و در هر مورد با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه‌های پروتئینی مشخص شد [16].

سنجش فعالیت آنزیم اوریکاز: سنجش فعالیت آنزیم براساس واکنش تریندر صورت گرفت [17]. در این واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم‌هایی با فعالیت اکسیدازی که هیدروژن پراکسید تولید می‌کنند استفاده می‌شود. در این واکنش معرف تریندر که شامل آمینوآنتی‌پیرین و فنول است برای سنجش استفاده می‌شود. هیدروژن پراکسید تولیدشده در اثر اکسیداسیون با فنول و آمینوآنتی‌پیرین واکنش داده و تولید ترکیبی رنگی به نام کوئینون‌ایمین یا کوئینون می‌کند. این واکنش توسط پراکسیداز تریچه کوه (HRP) کاتالیز می‌شود. کوئینون ترکیبی قرمز-بنفش است که در طول موج‌های ۵۰۰-۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود [15, 18-20]. برای تعیین فعالیت آنزیم اوریکاز از روش کینتیکی فوق، بافرهای زیر استفاده شده است:

۱) اسیداوریک ۲ میلی‌مولار در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷، ۲) کوکتل (معرف تریندر) شامل ۴-آمینوآنتی‌پیرین ۳۰ میلی‌مولار و فنول ۱/۵٪ در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر

Tunnelling-fold یا T-fold گفته می‌شود. مونومرها در اثر اتصالات هیدروژنی (بیش از ۴۰ پیوند هیدروژنی) با هم پیوند داده و به شکل دایمر در می‌آیند. در نهایت یک بشکه بتا با ۱۶ رشته بتا و ۸ هلیکس که بخش خارجی آن را می‌سازند، شکل می‌گیرد. تترامر فعال با اتصال دو دایمر توسط پیوندهای هیدروژنی شکل می‌گیرد [11] (شکل ۱).

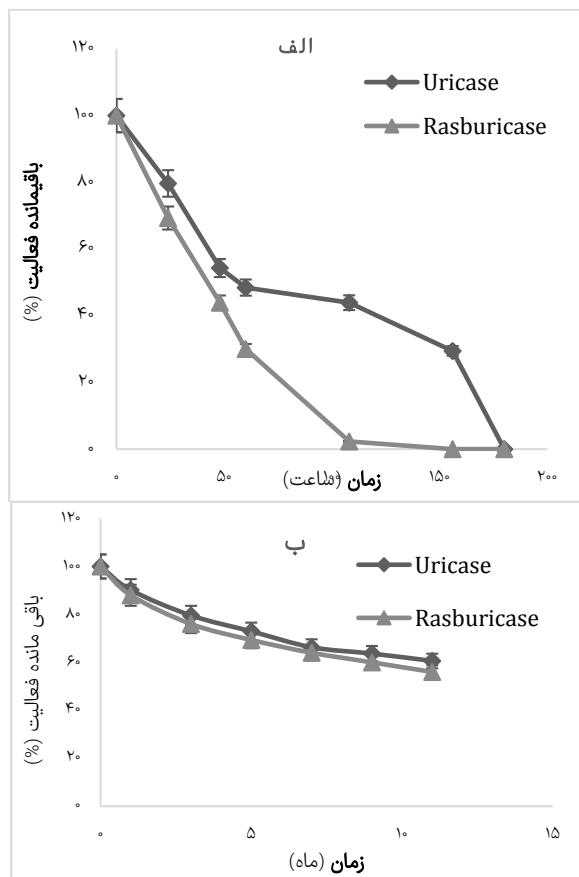
امروزه این آنزیم با منشأ *اسپرزیلوس فلاووس* به دو صورت تجاری Rasburicase و Uricozyme تولید می‌شود که برای کاربردهای درمانی مورد تایید FDA است. همچنین از این آنزیم در تهیه زیست‌حسگر برای کارهای تشخیصی استفاده وسیعی می‌شود [12-15]. در این مطالعه با توجه به اثرات بارز خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها و نیز افزایش پایداری پروتئین‌های دارویی از سوی دیگر، و با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی مانند نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، آنزیم اوریکاز در باکتری *شریشیا کلی* کلون، ترانسفرم و بیان شد و پس از بهینه‌کردن بیان و تخلیص، فعالیت و پایداری این آنزیم، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: در مطالعه تجربی حاضر اسیداوریک و فنول (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا)، ستون Ni-NTA (کیژن؛ آلمان)، کانامایسین و IPTG (فرمنتاز؛ کانادا)، سایر مواد شیمیایی مورد نیاز و همچنین کیت‌های استخراج پلاسمید (مرک؛ آلمان) به کار رفتند. سلول‌های باکتری *شریشیا کلی* (BL21 (DE3) نیز از شرکت نواژن (ایالات متحده) و سنتز ژن اوریکاز از شرکت ژن‌کاست (لوکزامبورگ) تهیه شد.

بیان آنزیم اوریکاز: از باکتری *شریشیا کلی* سویه DH5α به منظور ترانسفورم و تکثیر ژن استفاده شد. در این پژوهش سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان اختصاصی برای بیان ژن کلون‌شده استفاده شد. *شریشیا کلی* BL21 (DE3) پس از کشت در محیط 2XYT مایع حاوی ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم سدیم کلرید و آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شبانه روی شیکر و در دمای 37°C قرار گرفت. عمل تلقیح سپس از همین کشت‌های شبانه در ارلن‌های محتوی محیط کشت مایع 2XYT که از پیش استریل شده بودند و نیز محتوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین بودند، انجام شد. به منظور القا از IPTG ۰/۴ میلی‌مولار استفاده شد. میزان محیط کشت موجود در ارلن به نسبت یک پنجم حجم ارلن در نظر گرفته می‌شود تا بدین ترتیب طی رشد باکتری‌ها هوادهی مناسب انجام شود. به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت موجود در ارلن به میزان یک میلی‌لیتر از کشت شبانه افزوده شد و در دمای 37°C و دستگاه شیکر با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت. زمانی که OD باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به محدوده ۰/۷-۰/۴ رسید، IPTG به میزان ۰/۴ میلی‌مولار در کنار شعله و در شرایط استریل به محیط‌های حاوی باکتری افزوده شد. این ارلن‌ها مجدداً روی شیکر ولی این بار در دمای 30°C قرار گرفتند. پس از شش ساعت کشت، سپس سوسپانسیون باکتری‌های القاشده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $3500 \times \text{g}$ در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده، به حالت سوسپانسیون درآمد. بافر لیزکننده دارای pH برابر ۷ و حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس، ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول است. پس از آن سوسپانسیون باکتری تحت سونیکاسیون قرار گرفت. برنامه

بررسی پایداری حرارتی آنزیم و مقایسه آن با آنزیم رایج دارویی Rasburicase: پایداری آنزیم تولیدی اوریکاز نو ترکیب با آنزیم رایج دارویی Rasburicase در دماهای ۵۰، ۳۷، ۴ و ۲۰°C - بررسی شد. نتایج حاصله نشان دهنده پایداری بیشتر آنزیم اوریکاز در مقایسه با شکل رایج دارویی آن است. در دمای ۲۰°C، آنزیم دارویی بعد از ۱۰۸ ساعت تقریباً تمام فعالیت خود را از دست داده است در حالی که آنزیم اوریکاز نو ترکیب بعد از گذشت این زمان هنوز ۴۳% فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۱- الف). در دمای ۴°C، بعد از ۱۱ ماه آنزیم اوریکاز نو ترکیب ۶۰% و آنزیم دارویی ۵۰% فعالیت خود را حفظ کرده اند (نمودار ۱- ب).



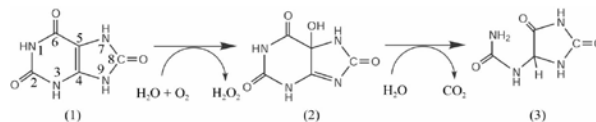
نمودار ۱) لگوی غیرفعال شدن در دماهای الف) ۲۰°C و ب) ۴°C در حضور تریس ۵۰ میلی مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون ۱۰۰% در نظر گرفته شده است. نتایج به دست آمده سه بار تکرار شده اند.

پایداری آنزیم اوریکاز در دمای ۲۵°C مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از گذشت ۴۸ ساعت Rasburicase تنها ۳۰% فعالیت خود را دارد در حالی که آنزیم اوریکاز نو ترکیب بیش از ۵۰% فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۲- الف).

در ادامه برای بررسی پایداری حرارتی آنزیم، دو دمای ۳۷ و ۵۰°C انتخاب شد و نتایج نشان داد که در دمای ۳۷°C بعد از گذشت ۴۸ ساعت آنزیم دارویی تقریباً تمام فعالیت خود را از دست داده است در حالی که آنزیم اوریکاز نو ترکیب هنوز فعال بوده و ۲۶% از فعالیت خود را حفظ کرده است (نمودار ۲- ب).

در دمای ۵۰°C آنزیم دارویی بعد از ۵ دقیقه فعالیتش به نصف رسیده و بعد از ۵۵ دقیقه تقریباً فعالیتش به صفر می رسد در حالی که آنزیم اوریکاز نو ترکیب بعد از ۲۰ دقیقه فعالیتش به نصف رسیده و بعد از یک ساعت مقدار باقیمانده فعالیت برابر ۷/۲% است (نمودار ۲- ج).

۳، ۷ پراکسیداز (HRP) ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر برای هر بار سنجش آنزیم در حجم ۳۵۰ میکرو لیتر؛ ۲۰۰ میکرو لیتر سوستر ۱۰۰ میکرو لیتر کوکتل و ۳۰ میکرو لیتر HRP و ۵۰ میکرو لیتر آنزیم اوریکاز وجود داشت که در ۵۱۰ نانومتر تغییرات جذب آنزیم توسط اسپکترو فوتمتر اندازه گیری شد و با در نظر گرفتن $\epsilon = 6/58 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه محاسبه شد (شکل ۲).

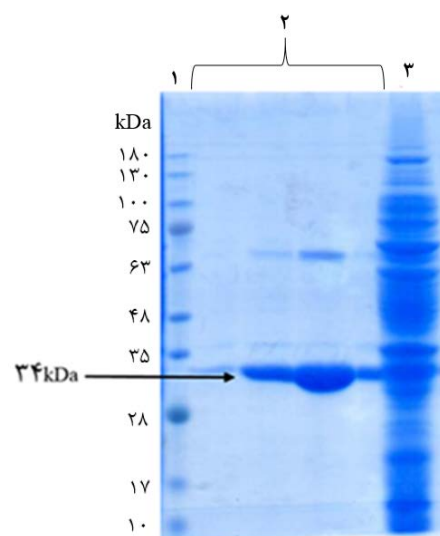


شکل ۲) واکنش تجزیه اسیداوریک به آلانتوئین با تولید حد واسط ۵- هیدروکسی ایزواورات (۲) فقط مرحله اول این مسیر با تولید H_2O_2 توسط آنزیم کاتالیز می شود.

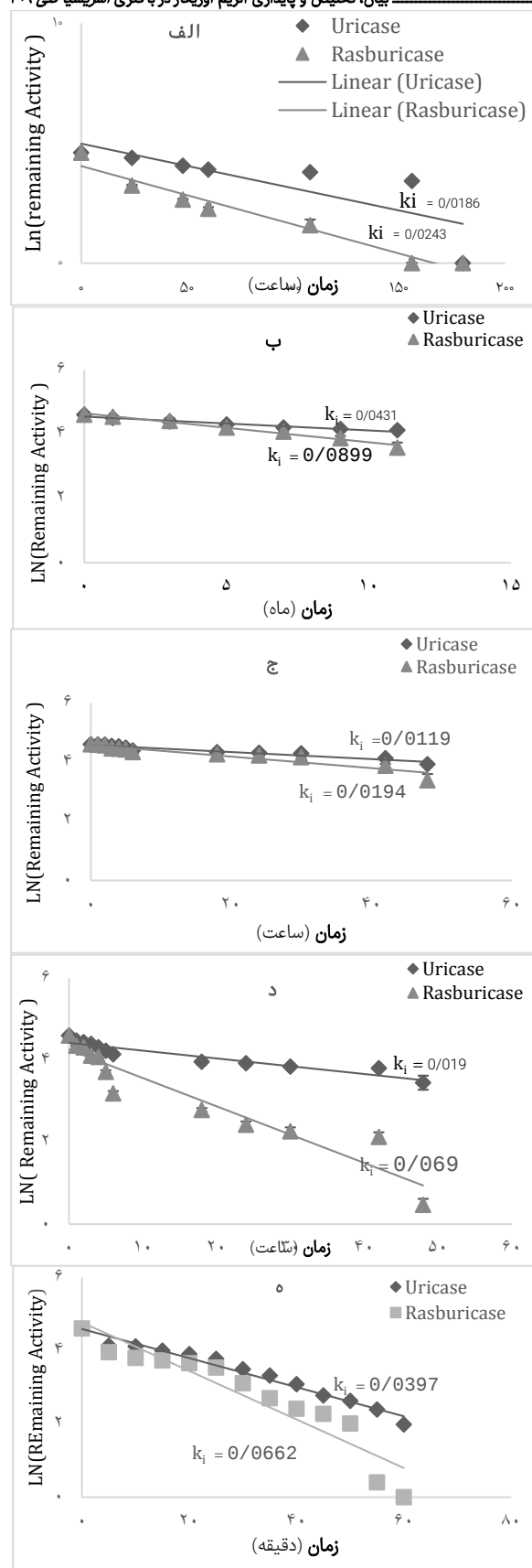
بررسی پایداری حرارتی آنزیم: پایداری حرارتی آنزیم در دو دمای ۳۷، ۵۰°C و پایداری دراز مدت آنزیم در دو دمای ۴ و ۲۰°C در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار با میزان pH برابر با ۷/۴ مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه گیری سرعت غیرفعال سازی با اندازه گیری فعالیت آنزیم پس از تیمار دمایی به دست می آید. به این منظور نمونه های آنزیم اوریکاز در زمان های مختلف پس از انکوباسیون از بن ماری خارج شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. فعالیت باقیمانده هر یک از نمونه ها طبق روش ارایه شده برای تعیین فعالیت آنزیمی، اندازه گیری شد. به عنوان کنترل آنزیم رایج دارویی به کار رفت. نمونه آنزیمی که در حرارت قرار نگرفته است به عنوان کنترل (۱۰۰% فعالیت) در نظر گرفته شد.

یافته ها

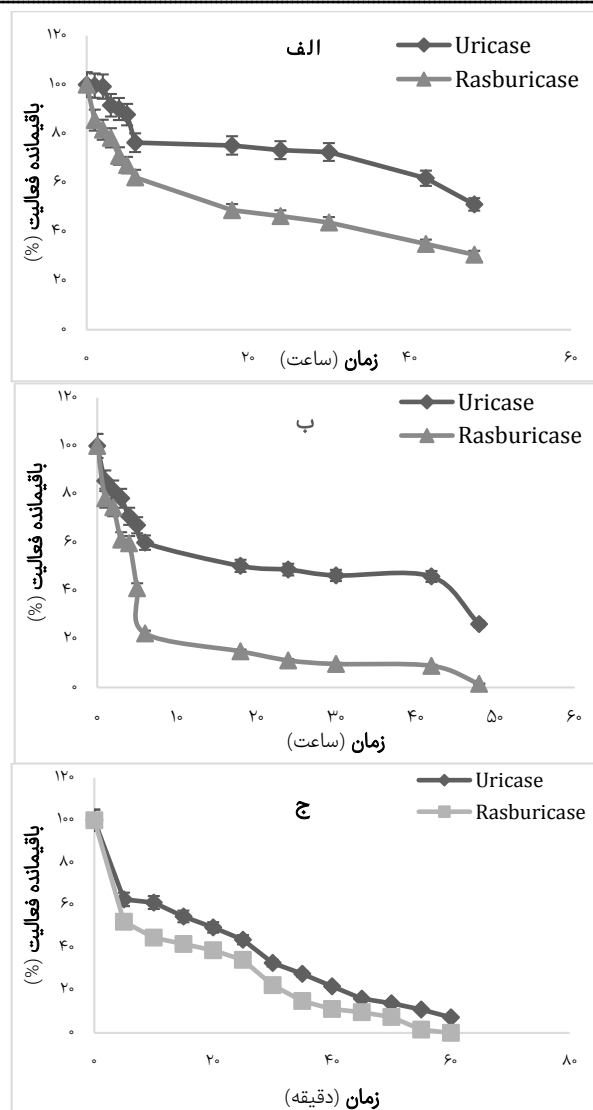
بیان و تخلیص آنزیم اوریکاز: بعد از انتقال وکتور حاوی ژن اوریکاز به میزبان بیانی مناسب و رسیدن به بیان بهینه با مشاهده ژل SDS-PAGE مشخص شد که آنزیم در مایع رویی است و سپس با استفاده از ستون نیکل سفارز تخلیص شد. بررسی ژل پلی آکریل آمید پس از الکتروفورز نمونه های تخلیص شده، تک باندهایی با وزن مولکولی حدود ۳۴ کیلو دالتون را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳) بررسی SDS-PAGE آنزیم اوریکاز؛ ۱) استاندارد وزن مولکولی (استاندارد وزن مولکولی بر حسب کیلو دالتون مشخص شده است)، ۲) باندهای مربوط به تخلیص پروتئین، ۳) نمونه قبل از تخلیص



نمودار ۳ ثابت غیرفعال سازی در دماهای پایداری حرارتی و درازمدت آنزیم در دماهای نگهداری (الف) -20°C و (ب) 4°C و (ج) دماهای (د) 25°C و (ه) 37°C در حضور تریس 50 میلی مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون 100% در نظر گرفته شده است. نتایج به دست آمده سه بار تکرار شده اند.



نمودار ۲ الگوی غیرفعال شدن (الف) دمای 25°C (ب) دمای 37°C (ج) دمای 50°C در حضور تریس 50 میلی مولار؛ فعالیت اولیه آنزیم قبل از انکوباسیون 100% در نظر گرفته شده است. نتایج به دست آمده سه بار تکرار شده اند.

ثابت غیرفعال سازی در دماهای مختلف: با به دست آوردن و بررسی ثابت غیرفعال سازی در دماهای پایداری حرارتی و درازمدت آنزیم (جدول ۱)، نتایج نشان داد که آنزیم اوریکاز نو ترکیب در تمامی دماهای مورد بررسی نسبت به آنزیم اوریکاز نو ترکیب پایداری بیشتری دارد و با سرعت کمتری فعالیت خود را از دست می دهد (نمودار ۳). با در نظر گرفتن کاهش فعالیت آنزیم نسبت به زمان و فرض درجه اول بودن واکنش مربوطه، ثابت سرعت غیرفعال شدن محاسبه و در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که در همه دماهای مورد مطالعه پایداری آنزیم اوریکاز نو ترکیب مقاومت بیشتری نسبت به آنزیم رایج دارویی دارد.

جدول ۱ ثابت غیرفعال سازی آنزیم اوریکاز نو ترکیب و تجاری در دماهای مختلف

دما	k_i آنزیم اوریکاز	k_i آنزیم دارویی
-20°C	0/0186 ± 0/0009	0/0243 ± 0/0012
4°C	0/0431 ± 0/0021	0/0899 ± 0/0044
25°C	0/0119 ± 0/0005	0/0194 ± 0/0009
37°C	0/019 ± 0/0001	0/069 ± 0/0034
50°C	0/0397 ± 0/0019	0/0662 ± 0/0033

گیرد. این نتایج در جمع‌آوری اطلاعات برای یک آنزیم دارویی الزامی است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر مقدار پایین آنزیم فعال به‌دست‌آمده است. پیشنهاد می‌شود که در ادامه به‌منظور بررسی بیشتر و کامل‌تر مطالعات زیر صورت گیرد:

۱) به‌کاربردن راهکارهای مختلفی به‌منظور رفع نقیصه‌های این داروی پروتئینی و افزایش پایداری آن از جمله اصلاحات بعد از تولید نظیر اتصال به پلیمرهای سنتزی یا طبیعی به سطح پروتئین مانند پگیلاسیون که به‌عنوان فرآیندی موفقیت‌آمیز مطرح شده است.
۲) استفاده از مواد نانو ساختار برای تثبیت و پایداری این آنزیم که نه تنها باعث افزایش پایداری فعالیت آنزیم می‌شود، بلکه سایر خواص ویژه آن، به‌عنوان یک سیستم نانوکاتالیست زیستی، را هم تقویت می‌کند. از جمله این ساختارها لیپوزوم‌ها هستند که به‌دلیل خصوصیات آمفیپاتیک (دوگانه‌دوست) عناصر سازنده آن، امکان دارورسانی داروهای هیدروفیل و لیوفیل را فراهم می‌نمایند. ویژگی‌هایی از قبیل سمیت ذاتی پایین، زیست‌تجزیه‌پذیری و فقدان ایمونوژنیسیته، سبب شده است که لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل بسیار مناسب در سیستم‌های دارورسانی نوین مورد توجه واقع شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی چون نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، پایداری بالای آنزیم به‌دست‌آمده به‌منظور توسعه اشکال با پایداری بالای آنزیم به‌عنوان مصارف دارویی می‌تواند حائز اهمیت قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سمیه دانشجو (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵٪)، الهه سادات دشتیان مقدم (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)، محمودرضا جعفری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)، سیدمهدی رضایت (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)، خسرو خواجه (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵٪)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Rodriguez-Martinez JA. Improving the in vitro stability of proteins by PEGylation [Dissertation]. Puerto Rico: University of Puerto Rico, ProQuest Dissertations Publishing; 2010.
- 2- Arlington S, Barnett S, Hughes S, Palo J. Pharma 2010: The threshold of innovation [Internet]. Unknown City: IBM Institute for Business Value; 2002 [cited 2018 May 15]. Available from: https://www.pharmamanufacturing.com/assets/Media/MediaManager/ibm_pharma2010_threshold-of-innovation.pdf
- 3- Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. 2nd edition. 10th Volume. Cambridge: Academic press; 2010.
- 4- Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: An update. Pharm Res. 2010;27(4):544-75.
- 5- Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A

یکی از مهم‌ترین مباحث در زیست‌فناوری نوین و مهندسی پروتئین، پایداری پروتئین‌ها و به‌ویژه آنزیم‌ها به‌منظور استفاده از آنها در صنعت و داروسازی بوده است و در این راستا نیز تاکنون، راهکارهای گوناگون و متنوعی برای پایداری انواع پروتئین‌ها گزارش شده است^[4]. همان‌طور که قبلاً هم اشاره شد اخیراً بسیاری از داروهای جدید بر پایه فناوری‌های زیستی و استفاده از پروتئین‌ها بنا نهاده شده‌اند. شناخت پایداری آنزیم‌های دارویی از اهمیت بسزایی در رفع مشکلات پیش‌رو به‌منظور توسعه داروهای پروتئینی و همچنین موفقیت آن در درمان برخوردار است.

بهبود پایداری اوریکاز، در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، تثبیت آنزیم با استفاده از میکروکپسول‌های آلژینات^[18]، اتصال عرضی آلبومین و اوریکاز که باعث پایداری حرارتی آن و مقاوم شدن به پروتئولیز می‌شود و نیمه‌عمر آنزیم را نسبت به آنزیم وحشی تا شش‌برابر افزایش می‌دهد^[19]، تثبیت اوریکاز روی اریتروسیت‌ها به‌عنوان حامل یا اتصال اوریکاز به غشای خارجی اریتروسیت که به‌دلیل غلظت بالای اریتروسیت‌ها با کارایی و سرعت زیادی (۲۱ میکرومول بر لیتر در دقیقه) می‌تواند اسیداوریک را تجزیه کند^[20]، کونژوگ کردن اوریکاز با دکستران یا پلی‌اتیلن‌گلیکول^[21]، پگیلاسیون اختصاصی اوریکاز و تولید پوریکاز^[22]، و استفاده از نانولیپوزوم‌ها به‌عنوان پوششی برای جلوگیری از صدمه به ساختار آنزیم از این رو مورد توجه قرار گرفته است که همزمان می‌تواند فعالیت و پایداری آنزیم را بالا ببرد^[23].

مشکلی که در این روش‌ها وجود دارد، غیرفعال شدن آنزیم در طی مراحل تثبیت آنزیم و اتصال آن به سطح است، که گاهی باعث تغییر کنفورماسیون آنزیم تثبیت شده است. همچنین مشکلاتی از قبیل میانکنش آنزیم با سطح بستر، ناپایداری فیزیکی بستر تثبیت به‌دلیل تولید حباب‌های اکسیژن در اثر فعالیت آنزیم، کاهش فعالیت آنزیم در pH فیزیولوژیک و آمادگی یوریکاز برای خروج از وزیکول‌ها نیز وجود دارند^[23].

به‌طور کلی راهکارهای مختلفی برای رفع نقیصه‌های داروهای پروتئینی و افزایش پایداری آنها مطرح است. از جمله این راهکارها، مهندسی واکنش حد واسط، ایجاد ساختار آنزیمی با پایداری بیشتر با تغییر محیط اطراف آنزیم نه خود آنزیم است^[24].

در تحقیق حاضر، پس از ترانسفورم، بیان آنزیم با شرایط مختلف بررسی و شرایط بهینه انتخاب شد. پس از تخلیص آنزیم به‌دست‌آمده، میزان فعالیت و پایداری آنزیم اوریکاز در شرایط مختلف دمایی، بررسی و با نمونه رایج دارویی آنزیم مقایسه شد.

با توجه به مطالعات پایداری حرارتی این آنزیم، دارای پایداری بیشتری در دماهایی مانند ۲۵°C، ۳۷°C و ۵۰°C نسبت به آنزیم رایج دارویی هستیم. در دماهای ۴ و ۲۰°C نیز پایداری نسبت به آنزیم دارویی افزایش پیدا کرده است. با توجه به اهمیت بالای آنزیم اوریکاز در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی مانند نقرس و قیمت بالای این داروی وارداتی، پایداری مناسب این آنزیم به‌منظور توسعه اشکال پایدار آن به‌عنوان مصارف دارویی می‌تواند حائز اهمیت قرار گیرد.

در آخر باید ذکر کنیم که هر پروتئین به‌عنوان یک مولکول بی‌همتا، رفتار متفاوتی با پروتئین‌های دیگر حتی در شرایط یکسان نشان می‌دهد. بنابراین برای بررسی تغییر فعالیت و پایداری پروتئین‌ها نیاز است که شواهد و مدارک بیشتری داشته باشیم و پژوهش‌های بیشتری در این زمینه در رابطه با آنزیم‌ها و پروتئین‌های دیگر صورت

- Leukemia. 2001;15(10):1505-9.
- 15- 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.
- 16- Prencipe L, Fossati P, Vanzetti G. Enzymatic determination of uric acid in serum with the trinder reaction (author's transl). *Quad. Sclavo Diagn*. 1978;15(3):382-94. [Italian]
- 17- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- 18- O'loughlin JA, Bruder JM, Lysaght MJ. Degradation of low molecular weight uremic solutes by oral delivery of encapsulated enzymes. *Asaio J*. 2004;50(3):253-60.
- 19- Poznansky MJ. In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricase-albumin polymers: A model for enzyme therapy. *Life Sci*. 1979;24(2):153-8.
- 20- Ihler G, Lantzy A, Purpura J, GLEw RH. Enzymatic degradation of uric acid by uricase-loaded human erythrocytes. *J Clin Invest*. 1975;56(3):595-602.
- 21- Yasuda Y, Fujita T, Takakura Y, Hashida M, Sezaki H. Biochemical and biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol. *Chem Pharm Bull. (Tokyo)*. 1990;38(7):2053-6.
- 22- Veronese FM, Pasut G. PEGylation: Posttranslational bioengineering of protein biotherapeutics. *Drug Discov. Today Technol*. 2008;5(2-3):e57-64.
- 23- Tan QY, Wang N, Yang H, Zhang LK, Liu S, Chen L, et al. Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. *Int J Pharm*. 2010;384(1-2):165-72.
- 24- Hegedus I, Nagy E. Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles. *Chem Eng Sci*. 2009;64(5):1053-60.
- formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):298-306.
- 6- Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*. 2009;98(9):2909-34.
- 7- 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.
- 8- Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S, Geske R, Montgomery Jr C, Jones P, et al. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(2):742-6.
- 9- Arora K, Sumana G, Saxena V, Gupta R, Gupta S, Yakhmi J, et al. Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. *Anal Chim Acta*. 2007;594(1):17-23.
- 10- Wang X, Hagiwara T, Uchiyama S. Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimidostyrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor. *Anal Chim Acta*. 2007;587(1):41-6.
- 11- Retailleau P, Colloc'h N, Vivares D, Bonnete F, Castro B, El-Hajji M, et al. Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: a reassignment of the active-site binding mode. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60(Pt 3):453-62.
- 12- Bosly A, Sonet A, Pinkerton R, McCowage G, Bron D, Sanz MA et al. Rasburicase (Recombinant Urate Oxidase) for the Management of Hyperuricemia in Patients with Cancer: Report of an international compassionate use study. *Cancer*. 2003;98(5):1048-54.
- 13- Pui CH. Rasburicase: a potent uricolytic agent. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3(4):433-42.
- 14- 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.