NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/42 , 2021

Scan online to view this article

Heterologous Expression, Purification and Determination of Activity of new Carboxypepetidase from *Cohnella* Ao1

Seyed Mahdi Naeemi[1], Saeed Aminzadeh[2*], Soyar Sari[1], Fahimeh Nemati[3], Maryam naseroleslami[1]

1- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Bioprocess Engineering Group, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
3- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Proteolytic enzymes are essential for the survival of living organisms by irreversible hydrolysis of peptide bond. Carboxypeptidases are proteolytic enzymes found in many organisms and are widely used in various industries, such as food and pharmaceuticals. Aims of this study are expression of carboxypeptidase of *chohnella* A01, purification and determination of its activity.

Materials and methods: The gene of carboxypeptidase of *cohnella* A01 has been cloned in pET26b(+) vector. Competent cells were prepared from *E. coli* BL21, plasmids were extracted and transformed to expression host. *E. coli* BL21 was cultured in LB medium and protein expression was induced by IPTG. After that cell harvested and recombinant protein was purified by Ni-TNA resin.

Results: The expressed recombinant enzyme is a glutamate carboxypeptidase that capable of separating glutamate from folic acid.

Conclusion: Hence carboxypeptidase G has medicinal application and recombinant carboxypeptidase from *cohnella* A01 is a thermostable enzyme, after optimization, can be use it for medicinal application.

Keywords: Carboxypeptidase, *Cohnella*, Folic Acid, Glutamate, IAU science

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

Corresponding author:
Bioprocess Engineering Group, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
Email: aminzade@nigeb.ac.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۲ - بهار ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بیان هترولوگ، خالص سازی و سنجش فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب جدید از باکتری *کوهنلا* A01

سید مهدی نعیمی[۱]، سعید امین زاده*[۲]، سویار ساری[۱]، فهیمه نعمتی منصور[۴]، مریم ناصرالاسلامی[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران
۲- گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط‌زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین یا پروتئولایتیک با انجام هیدرولیز برگشت‌ناپذیر پیوند پپتیدی برای ادامه بقای موجودات زنده ضروری هستند. کربوکسی‌پپتیدازها از جمله آنزیم‌های پروتئولایتیکی هستند که در موجودات بسیاری یافت می‌شوند و از این آنزیم‌ها در صنایع مختلف - مثل صنایع غذایی و داروسازی – به‌وفور استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق، بیان آنزیم کربوکسی پپتیداز باکتری بومی *کوهنلا* A01، خالص‌سازی و سنجش فعالیت آن است.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژن کربوکسی پپتیداز *کوهنلا* A01 که در وکتور pET-26b(+) کلون شده بود؛ با ایجاد سلول‌های مستعد از باکتری میزبان بیانی (*اشرشیاکلی* BL21) وارد آن گردید. این باکتری در محیط کشت LB تلقیح و با استفاده از IPTG ، بیان پروتئین القا شد. سپس سلول‌ها جمع‌آوری، شکسته شده، پروتئین بیان شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل سفاروز، تخلیص شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده مشخص نمودند که آنزیم نوترکیب بیان شده - طبق پیش‌بینی انجام شده - دارای ساختمان دومی با ۳۴ درصد مارپیچ آلفا، ۲۶ درصد صفحات بتا، ۵ درصد نواحی فاقد ساختار و ۳۵ درصد شامل لوپ و سایر ساختارها بوده، یک گلوتامات کربوکسی پپتیداز به‌شمار می‌رود. این آنزیم قادر است در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و pH معادل ۷، ریشه گلوتامات را از اسید فولیک جدا نماید. وزن مولکولی آن ۴۱/۶ kDa بوده، فعالیت محاسبه شده این آنزیم (با سوبسترای فولات) در شرایط سنجش، ۱۷۹ U/ml است.

نتیجه‌گیری: باتوجه‌به این‌که گلوتامات کربوکسی پپتیداز (کربوکسی پپتیداز G) دارای کاربرد دارویی است و کربوکسی پپتیداز نوترکیب *کوهنلا* A01 دارای مقاومت گرمایی و در نتیجه پایداری مناسب در دمای محیط است، به‌احتمال می‌توان از این آنزیم پس از بهینه‌سازی، در مصارف دارویی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی : اسید فولیک، کربوکسی پپتیداز، *کوهنلا*، گلوتامات، IAU science

مقدمه

آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین [۱]که باعث هیدرولیز برگشت‌ناپذیر پیوند پپتیدی می‌شوند؛ برش‌های بسیار اختصاصی بر روی سوبستراهای خود انجام می‌دهند (۱). این سوبستراها می‌توانند مولکول‌های پیام‌رسان، فاکتورها و هورمون‌های پپتیدی، پیش پروتئین‌ها و پیش آنزیم‌ها باشند

1 - Proteolytic

نویسنده مسئول:
گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط‌زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، ایران
پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

(۲). کربوکسی‌پپتیدازها از جمله این آنزیم‌های پروتئولایتیک هستند و در اغلب بافت‌های جانوری، گیاهی، حشرات، باکتری‌ها و مخمرها مشاهده و گزارش شده‌اند (۳). امروزه کربوکسی‌پپتیدازها در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی و بهداشتی کاربرد فراوان دارند. در صنایع غذایی از کربوکسی پپتیدازها برای تهیه پنیرهایی با طعم خاص (کاهش تلخی و بهتر نمودن عطر پنیر) استفاده می‌گردد (۴). هم‌چنین در گوشت‌های فرآوری شده، استفاده از کربوکسی‌پپتیدازهای به‌دست آمده از باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک، باعث ایجاد مزه مطلوب در گوشت فرآوری شده می‌گردد (۵). از کربوکسی‌پپتیداز A در کاهش میزان اُکاروتوکسین[1] که از سموم هم‌خانواده مایکوتوکسین‌ها[2] به‌شمار می‌رود استفاده شده است. این سموم که دارای قابلیت سرطان‌زایی، تراتوژنی و سمیت برای کبد هستند به‌طور غالب توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید شده و باعث آلودگی غلات و خشکبار می‌شوند (۶).

گلوتامات کربوکسی‌پپتیدازها یا خانواده کربوکسی پپتیداز G با توانایی ویژه خود در برش انتهای کربوکسیل ریشه اسیدآمینه گلوتامات در موتیف‌های ان-آسیل شناخته می‌شوند. سوبستراهای این موتیف‌ها می‌توانند شامل پپتیدیل، آمینواسیل، بنزوئیل، بنزیل اُکسیل کربونیل، فولیل یا پترویل باشند (۷). اولین توجهات به این آنزیم به‌دلیل توانایی آن در جدا نمودن ریشه گلوتامات از اسید فولیک و سایر آنالوگ‌های فولات مانند متوترکسات[3] که در شیمی درمانی بیماری سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند، جلب شد. این خصوصیت باعث می‌شد که این آنزیم از طریق تهی‌سازی فولات احیا شده مورد نیاز در سنتز DNA توسط سلول‌های توموری، قادر به مهار رشد سلول‌های توموری باشد. هم‌چنین این آنزیم با توانایی تجزیه متوترکسات - که مهار کننده آنزیم هیدروفولات ردوکتاز است - در کاهش میزان متوترکسات و در نتیجه کاهش مشکلات کلیوی بیمارانی که تحت درمان با متوترکسات هستند، بسیار مفید بوده است (۸). امروزه کربوکسی‌پپتیدازی که از باکتری *سودوموناس*[4] نژاد RS-16 به‌دست آمده است کربوکسی‌پپتیداز G_2 نام دارد و با نام تجاری وراکساز[5] در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).

باکتری‌ها منبع بسیار مناسبی برای تهیه آنزیم‌های اگزوپپتیداز به‌شمار می‌روند. هم‌چنین استخراج ژن از آن‌ها و کلون نمودن آن در باکتری‌های مناسب با سهولت بیش‌تری نسبت‌به سایر موجودات امکان‌پذیر است. در این میان آنزیم‌های به‌دست آمده از باکتری‌های ترموفیل و هایپرترموفیل مزیت‌های ویژه‌ای دارند (۱۰). باکتری‌های ترموفیل در دمای بیش از ۶۰ درجه سلسیوس و باکتری‌های هایپرترموفیل در دماهای بیش از ۸۰ درجه سلسیوس رشد و زندگی می‌کنند؛ به‌همین دلیل آنزیم‌های این باکتری‌ها به‌طور عادی دارای مقاومت دمایی بالایی بوده، در مواجه با افزایش دما، غیر فعال نمی‌شوند (۱۱).

باکتری گرمادوست *کوهنلا* A01 از باکتری‌های بومی ایران به‌شمار می‌رود. این باکتری از خانواده پائنی باسیله[6]، گرم مثبت و میله‌ای شکل بوده، دارای ژن آنزیم گلوتامات کربوکسی‌پپتیداز است. در صورتی‌که آنزیم مذکور همانند کربوکسی پپتیداز G_2 قادر به تجزیه فولات و متوترکسات باشد؛ نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند برای سایر تحقیقات در خصوص استفاده کاربردی از آنزیم کربوکسی‌پپتیداز باکتری *کوهنلا* A01 راه‌گشا باشد. در این مطالعه ژن آنزیم گلوتامات کربوکسی‌پپتیداز باکتری گرمادوست *کوهنلا* A01 - که قبلا در وکتور (+)pET-26b و در باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α کلون شده بود (۱۲) - به باکتری *اشرشیاکلی* سویه BL21 وارد، بیان گردید و پس از تخلیص پروتئین، فعالیت کربوکسی پپتیدازی این آنزیم سنجش شد.

مواد و روش‌ها

مواد

اجزای محیط کشت LB، اسید فولیک، بافر Tris-HCl، SDS ، EDTA و نمک‌های مورد استفاده از مرک، پلی اکریل آمید، آنتی بیوتیک کانامایسین، IPTG[7] از سیگما و ایمیدازول از فلوکا خریداری شد. ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل –

1 - Ocharotoxin
2 - Mycotoxins
3 - Methotrexate
4 -*Pseudomonas* sp. Strain RS-16

5 - Voraxaze
6 - Paenibacillaceae
7 - Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

سفاروز[1] و ستون نمک‌زدایی[2] از شرکت GE Healthcare خریداری گردید.

دستگاه‌ها

از دستگاه FPLC[3] شرکت AKTA Purifier، دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اسپکترواستار نانو[4] شرکت BMG و دستگاه الکتروفورز شرکت Bio-Rad استفاده شد.

نرم‌افزارها

از پایگاه داده‌های NCBI ، Expasy و سرور آنلاین Phyre[2] استفاده شد.

بررسی‌های نرم‌افزاری

توالی DNA این پروتئین با استفاده از پایگاه داده Expasy به توالی پروتئینی ترجمه شد. با بلاست نمودن توالی پروتئین مورد بررسی در سایت‌های NCBI و Expasy، میزان مشابهت این پروتئین با سایر کربوکسی پپتیدازها تعیین و درخت فیلوژنتیک آن رسم گردید. با استفاده از ابزار ProtParam پایگاه داده Expasy، شاخص‌های آلیفاتیک و پایداری و pI آنزیم مشخص شد، هم‌چنین با استفاده سرورهای آنلاین SignalP و Phyre[2] به‌ترتیب وجود نواحی مشابه با پپتید نشانه[5] در توالی آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب باکتری کوهنلا A01 (کربوکسی پپتیداز ۳۰۲) و پیش‌بینی ساختار دوم و هم‌ترازی آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 بررسی شد.

تکثیر باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α و استخراج پلاسمید

باکتری اشرشیاکلی DH5α که دارای وکتور pET26b(+) حامل ژن کربوکسی پپتیداز باکتری *کوهنلا* A01 بود، در محیط کشت LB به‌مدت یک شبانه روز کشت داده شد. سپس به‌منظور استخراج پلاسمیدهای تکثیر شده؛ ابتدا باکتری‌ها با استفاده از بافر Tris با غلظت ۲۵ میلی‌مولار (حاوی EDTA با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و گلوکز با غلظت ۵۰ میلی‌مولار) و سپس با استفاده از محلول حاوی سود ۰/۱ مولار و SDS یک درصد لیز شدند. محلول حاوی باکتری‌های لیز شده در g ۶۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. به محلول رویی به‌منظور حذف RNA و پروتئین‌ها به‌ترتیب RNase A وپروتئیناز K اضافه شد. سپس مخلوط کلروفرم و ایزوامیل به آن اضافه و در g ۸۰۰۰ به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. به محلول رویی ایزوپروپانول سرد اضافه شده، پس از نگهداری به‌مدت یک ساعت در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس، در g ۸۰۰۰ به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شده، پلاسمیدهای رسوب کرده بر روی دیواره ویال با استفاده از اتانول ۷۰٪ شسته، سپس اتانل در دمای محیط تبخیر شد. پلاسمیدها در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر محلول و جمع آوری گردید.

تهیه باکتری‌های مستعد از *اشرشیاکلی* سویه BL21 و انتقال پلاسمید به میزبان بیانی

از باکتری‌های *اشرشیاکلی* سویه BL21 که در مرحله رشد لگاریتمی قرار داشتند، با استفاده از کلرید کلسیم سرد با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، باکتری‌های مستعد به‌منظور انتقال پلاسمید تهیه شد. با استفاده از شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، ۱۰ میکرولیتر از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده از باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *اشرشیاکلی* سویه BL21 منتقل گردید. باکتری‌های مذکور در محیط کشت LB حاوی آگار و آنتی بیوتیک کاناماسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت داده شدند.

انتخاب باکتری نوترکیب مناسب

از تک کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین، ۳ کلنی انتخاب و به‌صورت جداگانه در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کاناماسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت، به‌مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. از کلنی‌های شماره ۱ الی ۳، در محیط کشت حاوی گلیسرول استوک تهیه و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس از استوک‌های مذکور، در محیط کشت LB کشت شبانه تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت شبانه در محیط کشت LB تلقیح شده، تا رسیدن به جذب نوری ۰/۵ -۰/۴ در طول موج ۵۵۰ نانومتر،

1 - HisTrap® HP affinity columns
2 - HiTrap® Desalting Column
3 - Fast protein liquid chromatography
4 - SPECTROstar Nano
5 - Signal Peptide

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

در شیکر انوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. با رشد باکتری‌ها و رسیدن محیط کشت به جذب نوری مورد نظر، قبل از القا، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به‌عنوان کنترل منفی برداشته شده، پس از سانتیرفیوژ در g ۶۰۰۰ و به‌مدت ۱۲ دقیقه، رسوب حاصل در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس بیان پروتئین با افزودن IPTG به‌مقدار نهایی ۱ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر محیط کشت، القا شد. دمای انکوباتور بر روی ۲۷ درجه سلسیوس و دور شیکر بر روی ۱۵۰ دور دقیقه تنظیم گردید. پس از ۲۴ ساعت، باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با g ۶۰۰۰ و به‌مدت ۱۲ دقیقه جمع‌آوری و رسوب‌های حاصل در دمای منفی بیست درجه سلسیوس نگهداری شدند. رسوب‌های جمع‌آوری شده قبل و بعد از القا بیان پروتئین، در ژل پلی اکریل آمید و در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) الکتروفورز شد.

بیان پروتئین نوترکیب

به‌منظور بیان پروتئین از استوک کلنی شماره ۲ در محیط کشت LB کشت شبانه تهیه شد، سپس ۱۰ میکرو لیتر از کشت شبانه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه تا رسیدن به جذب نوری ۰/۵ – ۰/۴ در طول موج ۵۵۰ نانومتر نگهداری شد. با رسیدن به جذب نوری موردنظر، با استفاده از IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر محیط کشت، بیان پروتئین القا شده، شیکر انکوباتور روی دمای ۲۷ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. پس از ۲۴ ساعت باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با g ۸۰۰۰ و به‌مدت ۱۴ دقیقه جمع‌آوری شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها را در بافر لیز حاوی Tris-HCl (pH:8) ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۲ میلی‌مولار و NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار به‌صورت سوسپانسیون درآورده، با سونیکاسیون روی یخ با قدرت ۸۰ درصد و ۰/۷ پالس در دقیقه ، طی ۵ چرخه زمانی (۴۵ ثانیه سونیکیت و ۱ دقیقه استراحت)، دیواره باکتری شکسته شد. سپس محلول فوق در دمای ۴ درجه سلسیوس و g ۱۸۰۰۰ به‌مدت ۱۴ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی حاوی پروتئین نوترکیب در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان تخلیص نگهداری شد.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

از ستون کروماتوگرافی تمایلی با رزین نیکل- سفاروز با حجم یک میلی‌لیتر برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. برای این منظور از بافرهای تعادل، شستشو و خارج کننده با غلظت‌های مختلف ایمیدازول طبق جدول شماره ۱ استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا با استفاده از بافر تعادل معادل ۵ برابر حجم ستون (۵ میلی‌لیتر) ستون شستشو داده شده، به تعادل رسید. سپس ۳ میلی‌لیتر محلول حاصل از لیز باکتری‌ها پس از فیلتر نمودن با فیلتر دارای منفذ ۰/۴۵ میکرومتر، از روی ستون نیکل-سفاروز عبور داده شد. پس از این مرحله ستون با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر بافر شستشو به‌منظور خارج نمودن پروتئین‌های اضافی شستشو شد. سپس با استفاده از بافر خروج با حجم ۲ میلی‌لیتر، پروتئین تخلیص شده از ستون نیکل سفاروز جدا و جمع‌آوری گردید.

جدول ۱- محلول‌های مورد نیاز جهت خالص‌سازی آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب توسط زرین نیکل-سفاروز

بافر اتصال (pH:8)	بافر شستشو (pH:8)	بافر خروج (pH:8)
Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار	Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار	Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار
NaCl (۵۰۰ میلی‌مولار)	NaCl (۵۰۰ میلی‌مولار)	NaCl (۵۰۰ میلی‌مولار)
Tween 20 (٪ ۰/۰۵)	Tween 20 (٪ ۰/۰۵)	Tween 20 (٪ ۰/۰۵)
ایمیدازول (۵ میلی‌مولار)	ایمیدازول (۲۵ میلی‌مولار)	ایمیدازول (۲۵۰ میلی‌مولار)

نمک‌زدایی از پروتئین تخلیص شده

پروتئین تخلیص شده، توسط ستون نمک‌زدایی و بافر Tris-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

HCl 50 mM (pH:۷/۲) و با استفاده از دستگاه FPLC[1] شرکت AKTA Purifier نمک‌زدایی شد و محلول پروتئینی جمع‌آوری شده برای ادامه آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم، محلولی به حجم ۳۰۰ میکرولیتر شامل بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار، $ZnCl_2$ ۰/۱ میلی‌مولار، NaCl ۵ میلی‌مولار و اسید فولیک ۵ میکرومولار تهیه و pH آن معادل ۷/۲ تنظیم شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کربوکسی پپتیداز (بافر Tris-Hcl ۵۰ میلی‌مولار، $ZnCl_2$ ۰/۱ میلی‌مولار، NaCl ۵ میلی‌مولار) به محلول مذکور اضافه شد. با توجه‌به این‌که دمای بهینه رشد باکتری *کوهنلا* A01 حدود ۵۰ درجه سلسیوس است، هر دو محلول قبل از مخلوط شدن با یکدیگر، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ مذکور پیش انکوبه شده بودند. بلافاصله پس از اضافه نمودن آنزیم، کاهش جذب در طول موج ۳۶۸ نانومتر و با فواصل یک دقیقه‌ای تا زمان ثابت شدن جذب اندازه‌گیری شد (۱۳،۱۴) و منحنی کاهش جذب در طول زمان رسم شد. شیب خط مذکور به‌دست آمده، تغییرهای جذب به ازای هر دقیقه ($\Delta OD/min$) محاسبه شد. هر واحد (U) فعالیت آنزیم معادل کاهش غلظت اسید فولیک برحسب میکرومول در دقیقه است. به‌منظور محاسبه فعالیت آنزیم از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Enzyme Activity } (U) = \frac{\Delta OD/min}{\varepsilon L}$$

L برابر با ۱ سانتی‌متر و طول مسیری است که نور طی نموده است (طول کووت مورد استفاده) و ε ضریب خاموشی است که برابر با گزارش موجود در مراجع معادل $7410\ M^{-1}cm^{-1}$ است (۱۵).

یافته‌ها

پیش‌بینی خصوصیت‌های بیوشیمیایی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲

وزن مولکولی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ برابر با ۴۱/۶ کیلو دالتون، شاخص ناپایداری[2] پروتئین نوترکیب مورد بررسی ۳۶/۶۴ و شاخص آلیفاتیک[3] آن معادل ۹۴/۰۱ است.

پیش‌بینی ساختار دوم

برای ساختمان دوم آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب مورد بررسی، ۳۴ درصد مارپیچ آلفا، ۲۶ درصد صفحات بتا، ۵ درصد نواحی فاقد ساختار و ۳۵ درصد شامل لوپ و سایر ساختارها پیش‌بینی شد که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد.

برآورد همترازی ساختمان دوم

توالی پروتئینی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲، حدود ۸۰ درصد با آنزیم متالوپپتیداز باکتری *پائنی باسیلوس* گونه cl141a مشابهت دارد. ولی با توجه‌به این‌که کریستالوگرافی آنزیم مذکور منتشر نشده است، از زنجیره A آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 که ۹۵ درصد از طول آن با آنزیم مورد بررسی، دارای مشابهت ۲۹ درصدی است، استفاده شد که نتایج آن در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

بررسی وجود توالی پپتید نشانه در پروتئین نوترکیب

براساس بررسی انجام شده آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب باکتری کوهنلا A01 فاقد هر گونه پپتید نشانه بوده، این پروتئین از غشاء باکتری به محیط کشت ترشح نمی‌گردد.

ارتباط فیلوژنیتیک آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با سایر آنزیم‌ها

با ایجاد همترازی بین توالی پروتئینی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با سایر آنزیم‌ها، بیش‌ترین قرابت بین این آنزیم و آنزیم متالوکربوکسی پپتیداز از خانواده بزرگ[4] M20 در باکتری *پائنی باسیلوس* مشاهده شد (شکل ۳).

انتخاب نمونه کشت داده شده باکتری نوترکیب مناسب

از بین نمونه‌های انتخاب شده، یک کلنی که پروتئین بیش‌تری را بیان کرده بود، انتخاب شد (شکل ۴). کلیه آزمایش‌های بعدی با استفاده از پروتئین بیان شده توسط باکتری‌های به‌دست آمده از استوک کلنی مذکور انجام شده است.

1 - Fast protein liquid chromatography

2 - Aliphatic index
1 - Instability index
4 - Super Family

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

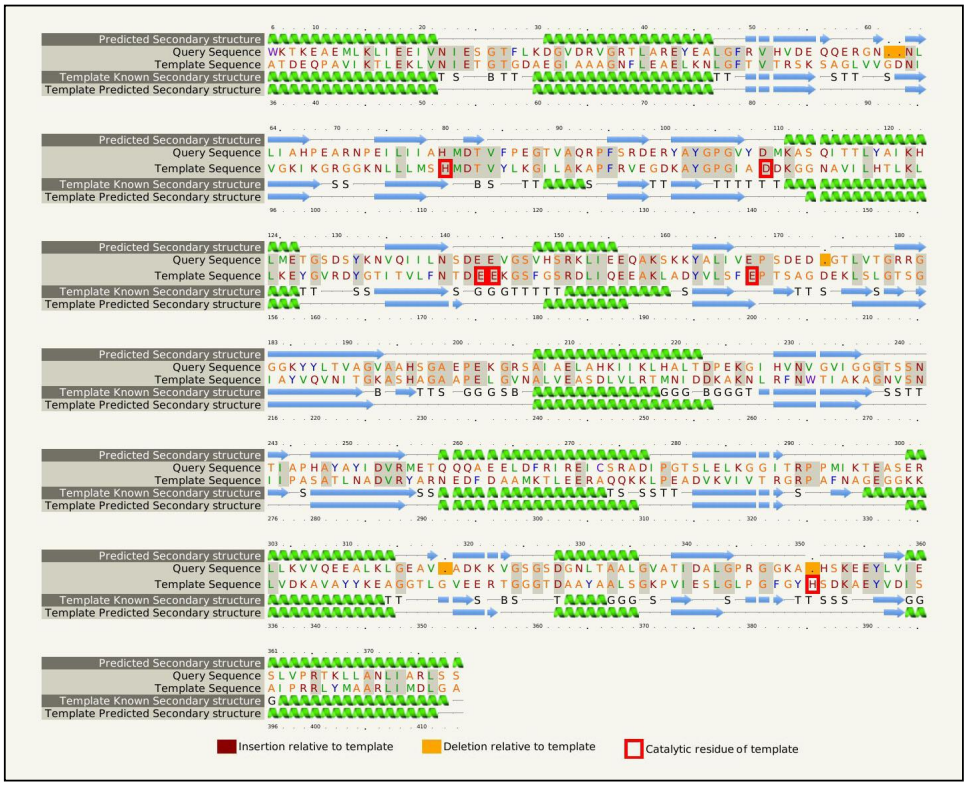
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]



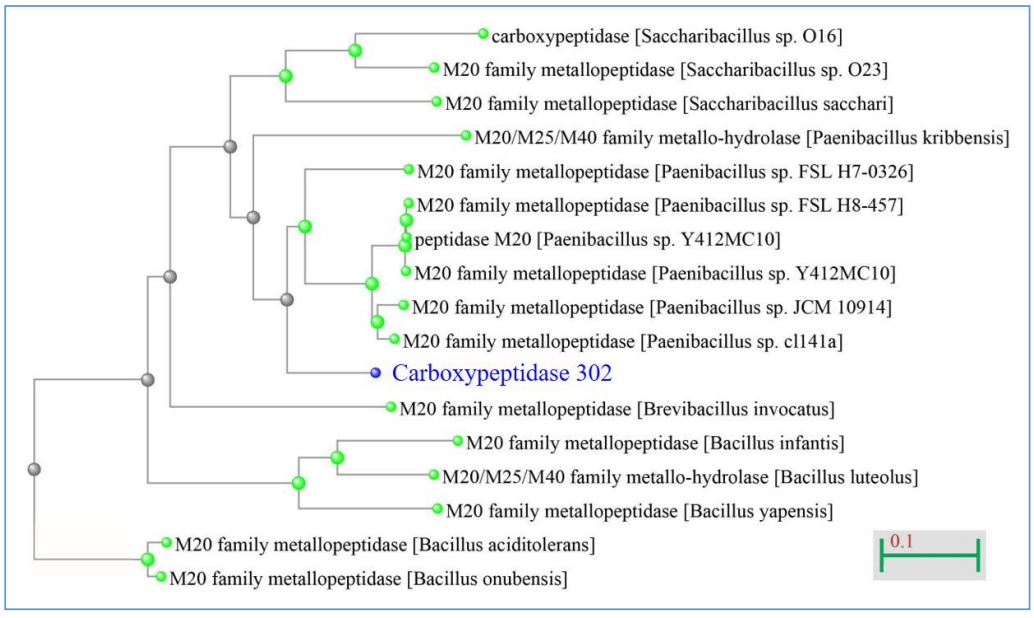
شکل ۱- ساختار دوم پیش‌بینی شده توسط سایت Phyre[2] برای آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب باکتری *کوهنلا* A01، ریشه اسیدآمینه‌های مشخص شده با رنگ قرمز نشان‌دهنده مناطق دارای احتمال بالای اطمینان و ریشه‌های مشخص شده با رنگ آبی تیره، مناطق دارای احتمال اطمینان ضعیف هستند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]



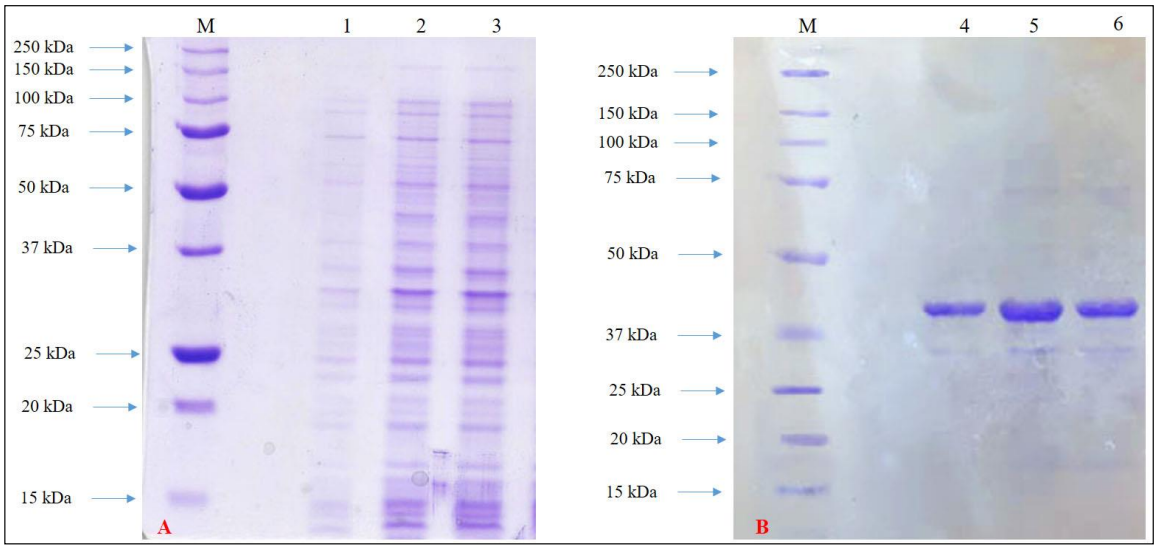
شکل ۲– هم‌ترازی پیش‌بینی ساختار دوم آنزیم کربوکسی پپتیداز نوترکیب باکتری *کوهنلا* A01 با زنجیره A آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 باکتری *سودوموناس* نژاد RS-16 . نواحی اضافه شده و حذف شده نسبت‌به توالی الگو به‌ترتیب با رنگ قرمز تیره و نارنجی مشخص شده است. ریشه اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده ناحیه فعال آنزیم الگو، با کادر قرمز رنگ مشخص شده‌اند.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک : بیش‌ترین قرابت بین کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با خانواده بزرگ متالوکربوکسی پپتیداز M20 در باکتری *پائنی باسیلوس* وجود دارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]



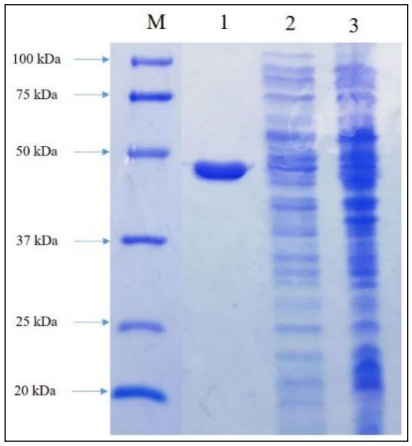
شکل ۴– تصویر A: ستون M شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون‌های ۱ الی ۳ به‌ترتیب کلنی‌های ۱ تا ۳ قبل از القا توسط IPTG . تصویر B: ستون M شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون‌های ۴ الی ۶ به‌ترتیب کلنی‌های ۱ تا ۳، بیست و چهار ساعت پس از القا توسط IPTG .

بیان و خالص‌سازی پروتئین

با استفاده از IPTG بیان پروتئین القا شد، به‌دلیل استفاده از وکتور pET26b(+) پروتئین نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدنی است. با استفاده از ستون حاوی رزین نیکل – سفاروز خالص‌سازی پروتئین انجام شد و باند پروتئین با وزن مولکولی ۴۱/۶ kDa با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS مشاهده شد (شکل ۵).

نمک‌زدایی از پروتئین تخلیص شده

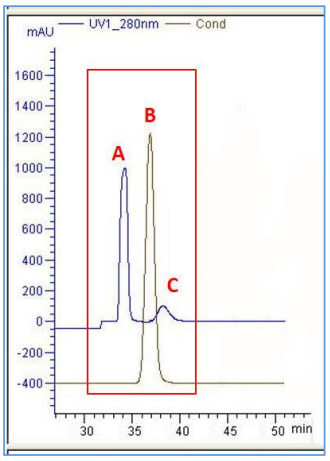
به ازای هر میلی‌لیتر آنزیم تخلیص شده، محلول نمک‌زدایی شده از آغاز پیک در طول موج ۲۸۰ نانومتر تا پایان آن جمع-آوری گردید (حدود ۲ میلی‌لیتر) و محلول حاوی نمک و ایمیدازول از لحظه افزایش پیک هدایت الکتریکی تا زمانی که این موج دوباره به‌حالت ثابت بر گردد، دور ریز شد (شکل ۶).



شکل ۵– تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل – سفاروز. ستون M: شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون ۱: پروتئین تخلیص شده. ستون ۲: محلول جمع‌آوری شده پس از شستشو با بافر شستشو. ستون ۳: محلول حاصل از لیز شدن باکتری‌ها، پس از عبور از ستون نیکل – سفاروز

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

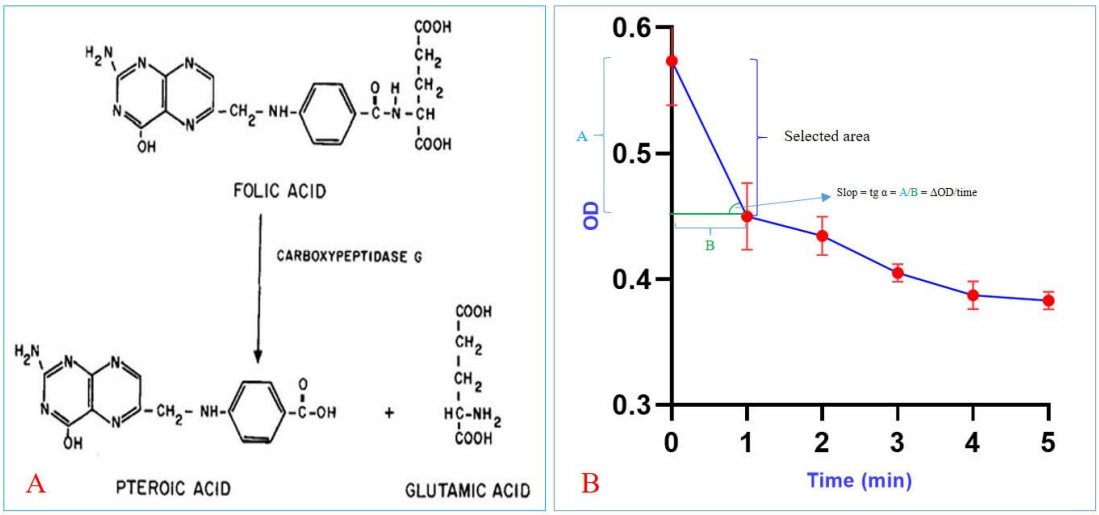
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]



شکل ۶– نمک‌زدایی از پروتئین خالص شده با استفاده از دستگاه FPLC : کادر قرمز رنگ نشان‌دهنده اولین تزریق به دستگاه است. پیک آبی رنگ A نشان‌دهنده خروج پروتئین نوترکیب از ستون نمک‌زدایی، پیک قهوه‌ای رنگ B نشان‌دهنده خروج NaCl از ستون و پیک آبی رنگ C نشان دهنده خروج ایمیدازول از ستون است.

سنجش فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲

پس از اضافه نمودن آنزیم مورد بررسی به محلول واکنش کاهش جذب در طول موج ۳۶۸ نانومتر مشاهده شد که نشان‌دهنده تجزیه اسید فولیک به پتروئیک اسید و اسید گلوتامیک است. فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ معادل ۱۷۹ U/ml محاسبه شده است. همان‌طور که در شکل ۷-A مشاهده می‌شود فولیک اسید توسط آنزیم کربوکسی پپتیداز G به پتروئیک اسید و گلوتامات تجزیه می‌شود که فولات دارای جذب در طول موج ۳۶۸ نانومتر بوده، محصولات حاصل از واکنش آنزیمی در طول موج مذکور فاقد جذب هستند. در شکل ۷-B نمودار تغییرات جذب در دقیقه نشان داده شده است.



شکل ۷- A: تجزیه اسید فولیک توسط آنزیم کربوکسی پپتیداز G (۱۳). B: نمودار کاهش جذب اسید فولیک در دقیقه ناشی از فعالیت کربوکسی پپتیداز ۳۰۲. از دقیقه یک به بعد به‌علت کاهش غلظت سوبسترا، شیب تغییرات جذب کاهش شدید پیدا کرده است و بنا براین در محاسبه فعالیت منظور نشده است.

بحث

آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ از ۳۸۲ ریشه اسیدآمینه و آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 (آنزیم الگو) از ۳۹۳ ریشه اسیدآمینه تشکیل شده است. هر دو آنزیم دارای قرابت نزدیک با خانواده بزرگ متالوکربوکسی پپتیداز بوده، برای عملکرد خود نیاز به حضور یون Zn^{2+} دارند. آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ در مقایسه با کربوکسی پپتیداز G_2 (آنزیم الگو) ۱۱ ریشه اسیدآمینه کم‌تر دارد ولی همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در درصد ساختارهای مارپیچ آلفا، صفحات بتا، لوپ و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

کویل و در نهایت نواحی فاقد ساختار، تفاوت چندانی بین این دو آنزیم مشاهده نمی‌شود. در برآورد هم‌ترازی این دو آنزیم که در شکل ۲ نشان داده شده است؛ مقایسه از ریشه اسیدآمینه شماره ۶ کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ و ریشه اسیدآمینه شماره ۳۶ آنزیم الگو آغاز شده - قابل ذکر است که ۲۲ ریشه اسیدآمینه از سمت انتهای آمینی آنزیم الگو، پپتید نشانه بوده و در هم‌ترازی لحاظ نشده است- و بیش‌ترین همسانی در اسیدآمینه‌هایی مشاهده می‌گردد که در اطراف اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده جایگاه فعال آنزیم الگو قرار دارند به‌طوری‌که این همسانی در نواحی بین ریشه اسیدآمینه‌های ۸۰ الی ۱۱۱ و ۱۴۰ الی ۱۶۹ آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ به‌ترتیب حدود ۵۲ و ۵۹ درصد است. از سوی دیگر از شش ریشه اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده ناحیه فعال کربوکسی پپتیداز G_2، محل قرار گرفتن و نوع اسیدآمینه در پنج ریشه اسیدآمینه آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ مطابقت داشته، در مورد اسیدآمینه ششم نیز فقط شیفتی به اندازه یک ریشه اسیدآمینه مشاهده می‌گردد و نوع اسیدآمینه‌ها یکسان است و به‌احتمال در آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ نیز ریشه اسیدآمینه‌های His80، Asp109، Glu143، Glu144، Glu168 و His152 تشکیل دهنده جایگاه فعال خواهند بود.

جدول ۲: مقایسه ساختمان دوم پیش‌بینی شده برای آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ و ساختمان دوم آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 (آنزیم الگو)

کربوکسی پپتیداز	تعداد اسیدآمینه	درصد ماریچ آلفا	درصد صفحات بتا	درصد نواحی فاقد ساختار	درصد لوپ و کویل	مرجع
۳۰۲	۳۸۲	۳۴	۲۶	۵	۳۵	این مطالعه
G_2	۳۹۳	۳۷	۲۵/۵	۳/۷۵	۳۳/۷۵	(۷)

سیستم بیانی pET یکی از سیستم‌های بیانی قوی است که برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در پروکاریوت‌ها به‌کار می‌رود، با توجه‌به این‌که ژن کربوکسی پپتیداز *کوهنلا* A01 قبلا در باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5α و در داخل وکتور pET26b(+) قرار داده شده بود (۱۲)؛ باکتری *اشرشیاکلی* سویه BL21 به‌عنوان میزبان بیانی انتخاب شد. هر چند یکی از معایب سیستم بیانی pET ترشح پروتئین به خارج از سلول تحت شرایط غیرالقایی است؛ اما القاء بیان پروتئین موردنظر با استفاده از IPTG باعث می‌شود این مشکل بر طرف گردد (۱۶). هم‌چنین پس از بررسی توالی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با استفاده از سرور SignalP مشخص شد که در داخل توالی پروتئینی این آنزیم، هیچ توالی مشابه با سیگنال‌های ترشحی وجود ندارد. البته در صنعت داروسازی برای تولید آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 از پپتید نشانه استفاده شده است تا فرآیند تولید آن با سهولت بیش‌تری همراه گردد. باقی‌ماندن آنزیم نوترکیب کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ پس از بیان در داخل سلول (در مقیاس آزمایشگاهی) دارای مزیت است به‌طوری‌که این مسأله هرچند مرحله شکستن سلول را به فرآیند تخلیص پروتئین اضافه می‌کند، اما مانع از تجزیه پروتئین نوترکیب در محیط -توسط پروتئازهایی که از سلول‌های مرده رها می‌شوند – شده، از سوی دیگر امکان نگهداری طولانی مدت باکتری‌هایی که آنزیم در آن‌ها بیان شده است را در دمای منفی بیست الی منفی هشتاد درجه سلسیوس فراهم می‌کند.

از آنجایی‌که کربوکسی پپتیدازها در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند، لذا پایدار بودن این آنزیم‌ها طی فرآیندهای صنعتی، نقش بسیار مهمی در کارایی و افزایش پتانسیل استفاده آن‌ها در صنعت دارا می‌باشد. همچنین در صورتی که آنزیم در محیط‌های in vivo مورد استفاده قرار گیرد، پایداری آن در برابر سایر آنزیم‌های تجزیه کننده و عوامل تأثیرگذار بر نیمه‌عمر آنزیم دارای اهمیت خواهد بود (۱۷). شاخص ناپایداری یکی از شاخص‌هایی است که می‌تواند تا حدی نشان‌دهنده پایداری آنزیم در محیط‌های in vivo باشد. این شاخص برای آنزیم کربوکسی پپتیداز معادل ۳۶/۶۴ و برای آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 معادل ۲۵/۳۳ است. با توجه‌به اعداد مذکور، آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ از جمله آنزیم‌های پایدار محسوب می‌گردد ولی در مقایسه، پایداری آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 بیش‌تر از آن است. هم‌چنین دارا بودن مقاومت گرمایی، علاوه‌بر افزایش نیمه‌عمر آنزیم، موجب سهولت تولید، تخلیص، نگهداری و استفاده شده، در برخی از موارد افزایش تنوع کاربرد را نیز به‌دنبال خواهد داشت. شاخص آلیفاتیک، نشان‌دهنده میزان حضور اسیدآمینه‌های آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین در پروتئین است، این اسیدهای

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

آمینه دارای زنجیره جانبی آبگریز هستند و هر چه مقدار این اسیدهای آمینه در پروتئینی بیش‌تر باشد مقاومت گرمایی آن پروتئین افزایش خواهد یافت (۱۸). آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با شاخص آلیفاتیک ۹۴/۰۱ دارای مقاومت گرمایی است. البته با توجه‌به این‌که باکتری *کوهنلا* A01 از باکتری‌های گرمادوست به‌شمار می‌رود، وجود درصد بالایی از اسیدهای آمینه آبگریز و در نتیجه مقاومت گرمایی در آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ مورد انتظار بود.

با توجه‌به این‌که دمای بهینه رشد باکتری *کوهنلا* A01 حدود ۵۰ درجه سلسیوس است، به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲، دمای ۵۰ درجه سلسیوس انتخاب شد و واکنش آنزیمی در pH معادل ۷/۲ و در حضور یون روی صورت گرفت. آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 یک متالوکربوکسی پپتیداز وابسته‌به روی است به‌نحوی‌که در صورت عدم حضور یون روی، آنزیم مذکور فاقد فعالیت آنزیمی است که این مسأله برای آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ نیز صادق بود و این آنزیم نیز بدون حضور یون روی، کارایی از خود نشان نمی‌دهد (جدول ۳).

همانند کربوکسی پپتیداز G_2 که می‌تواند ریشه گلوتامات را از متوترکسات جدا کند (۱۹) کربوکسی پپتیداز G استخراج شده از باکتری *Xenophilus azovorans* SN213 با نام کربوکسی پپتیداز Xen G_2 نیز قادر به این کار است (۲۰). هم‌چنین نوع دیگری از آنزیم کربوکسی پپتیداز G قادر است علاوه‌بر ریشه گلوتامات، ریشه آسپارات را نیز از انتهای کربوکسیل زنجیره پپتیدی جدا نماید و با نام کربوکسی پپتیداز G_3 معرفی شده است (۲۱). برخی از خصوصیت‌های بیوشیمیایی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ در مقایسه با کربوکسی پپتیدازهای G_2 و G_3 در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

جدول ۳: مقایسه برخی از خصوصیت‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های کربوکسی پپتیدازهای ۳۰۲، G_2 و G_3

کربوکسی پپتیداز	فعالیت آنزیم (U/ml)	وزن مولکولی (kDa)	pI	کوفاکتور	سوبسترا	شاخص آلیفاتیک	شاخص ناپایداری	مرجع
۳۰۲	۱۷۹	۴۱/۶۰	۵/۷۵	روی	فولات	۹۴/۰۱	۳۶/۶۴	این مطالعه
G_1	۱/۲۲	۴۶	-	روی	فولات	-	-	(۱۳)
G_2	۲۸۱	۴۱/۸۰	۷/۸	روی	فولات	۹۳/۱۸	۲۵/۳۳	(۱۹)
Xen G_2	۲۴/۳	۴۱/۷۶	-	روی	متوترکسات	-	-	(۲۰)
G_3	۲۶/۷	۶۰	۶/۲۲	روی، کلسیم	پلی گلوتامات پلی آسپارتات	-	-	(۲۱)

نتیجه‌گیری

فولات‌ها به‌عنوان کوآنزیم در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی از جمله سنتز DNA نقش دارند. بنابراین استفاده از یک سیستم کاهنده فولات باعث توقف رشد سلول‌های سرطانی خواهد شد (۲۲). در حال حاضر در صنایع دارویی از آنتاگونیست‌های فولات مانند متوترکسات، لوکوورین و ۵ متیل تترا هیدروفولیک اسید به‌عنوان موادی که در رقابت با اسید فولیک موجب مهار آنزیم تترا هیدرو فولات ردوکتاز - که نقش اساسی در سنتز پورین‌ها و پریمیدین‌ها دارد- می‌شوند، در درمان برخی از سرطان‌ها استفاده می‌گردد. متوترکسات یکی از داروهایی است که به وفور برای جلوگیری از رشد سریع سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). متأسفانه افزایش سطح سرمی متوترکسات در بیمارانی که با استفاده از این دارو تحت درمان قرار می‌گیرند، در دراز مدت به نارسایی کبد و کلیه می‌انجامد. از این رو استفاده از دارویی که قادر به تجزیه متوترکسات به مواد بی‌ضرر باشد، ضروری خواهد بود. در حال حاضر آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 که از باکتری *سودوموناس* نژاد RS-16 تهیه شده است با نام تجاری Voraxaze برای کاهش سطح سرمی متوترکسات مورد استفاده قرار می‌گیرد که دمای نگهداری مناسب آن ۸-۲ درجه سلسیوس است (۲۴). ولی آنزیم‌هایی که از

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

میکروارگانیسم های گرمادوست تهیه می‌شوند دارای پایداری حرارتی مناسبی هستند. از این رو، با توجه‌به این‌که کربوکسی پپتیداز نوترکیب باکتری *کوهنلا* A01 قادر به تجزیه فولات است، بررسی های بیش‌تر در خصوص تعیین ساختار، خصوصیت‌های بیوشیمیایی و سینتیکی، توانایی تجزیه متوترکسات و مقایسه کارایی آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 می‌تواند امکان بهینه‌سازی و استفاده از این آنزیم را در صنایع دارویی مشخص سازد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از بخشی از نتایج پایان‌نامه دکتری زیست-شناسی سلولی و مولکولی دانشکده علوم نوین دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران است که با کد ۲۲۵۳۰۵۵۴۹۷۲۰۲۱ در این دانشگاه به‌ثبت رسیده است. هم‌چنین از آقای مصطفی حاج هادی که مراحل کلونینگ این ژن را برعهده داشته‌اند و از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که امکان این پژوهش را فراهم نمودند، کمال تشکر را داریم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

منابع

1- Gomis X, Ruth F. Structure and Mechanism of Metallocarboxypeptidases. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2008; 43:319–345.

2- Barrett A.J, Rawlings N.D, Woessner J.F. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd Edition. London: Elsevier Academic Press; 2013

3- Hayashi R, Moore S, Stein W.H. Carboxypeptidase from Yeast. Biol. Chem. 1973; 218 (7): 2296-2302.

4- Ceruti1 R.J, Pirola M.B, Ramos E, Robert L, Rubiolo A.C, Sihufe G.A. Use of an Exogenous Carboxypeptidase to Accelerate Proteolysis in Reggianito Cheese. Czech J. Food Sci., 34, 2016 (5): 445‑455

5- Eck P. Recombinant DNA Technologies in Food. In: Eskin M. Shahidi F. Biochemistry of food. 3rd ed. Cambridge: academic Press; 2013. p. 503-556

6- Varga J, Toth B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. Acta Vet Hung. 2005; 53(2):189-203

7- Rowsell S, Pauptit R.A, Tucker A.D, Melton R.G, Blow D.M, Brick P. Crystal structure of carboxypeptidase G_2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. Structure. 1997 5; 3: 337-347

8- Sadeghian I, Khalvati B, Ghasemi Y, Hemati S. TAT-mediated intracellular delivery of carboxypeptidase G2 protects against methotrexate-induced cell death in HepG2 cells. TAAP. 2018; 346: 9-18

9- Rattu M.A, Shah N, Lee J.M, Pham A.Q, Marzella N. Glucarpidase (Voraxaze), a Carboxypeptidase Enzyme for Methotrexate Toxicity. P T. 2013; 38(12): 732, 741-744

10- Okai M, Yamamura A, Hayakawa K, Tsutsui S, Miyazono K, and et al. Insight into the transition between the open and closed conformations of Thermus thermophilus carboxypeptidase. Biochem Biophys Res. 2017; 484: 787-793.

11- Khaleghinejad S.H, Karkhane A.A, Motalleb G.R, Aminzadeh S, and Yakhchali B. Cloning, expression and characterization of chimeric *Bacillus Thermocatenulatus* Lipase in *E. coli.* Molecular and Cellular Research. 2015; 28 (2): 202-210

12- Hajhadi M, Cloning, Expression, Purification and Characterization of Carboxypeptidase G_2 Enzyme from thermophile bacteria *cohnella* sp.A01 in Ecoli. Iran, Institute higher education of nourdanesh, 2016.

13- McCullough L, Chabner B.A and Berton R. Purification and Properties of Carboxypeptidase G_1. Biological Chem. 1971; 246 (23): 7207-7213

14- Jeyaharan D, Aston P, Garcia-Perez A, Schouten J, Davis P, Dixon AM. Soluble expression, purification and functional characterization of carboxypeptidase G2 and its individual domains. Protein Expression and Purification. 2016; 127: 44-52

15- Carl C. Goldman L. Goldman P. The Enzymatic Hydrolysis of Methotrexate and Folic Acid. Biological Chem. 1966; 242 (12): 2933-2938

16- Rezaei S, Farhad Talebi A. Progress in Escherichia coli production of recombinant proteins. NCBMJ. 2020; 10 (38): 9-27

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

17- Guruprasad K, Reddy B, Pandit M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering. 1990, 4 (2): 155-161

18- Ikia A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. Biochem. 1980, 88: 1895-1898

19- Sherwood R.F, Melton R. G, Shakir M, Hughes A, Hughes P. Purification and properties of carboxypeptidase G_2 from Pseudomonas sp. strain RS- 16. Eur. J. Biochem. 1985, 148: 447-453

20- Yasuda N, Kaneko M, Kimura Y. Isolation, Purification and Characterization of a New Enzyme from *Pseudomonas* sp. M-27, Carboxypeptidase G_3. Biosci. Biotech. Biochem. 1992, 56 (10): 1536-1540

21- Rashidi F. B, Alqahtani A. D, Bashraheel S. S, Shaabani Sh, Groves M. R, Domling A, Goda S. K. Isolation and molecular characterization of novel glucarpidase: Enzymes to improve the antibody directed enzyme pro-drug therapy for cancer treatment. Plos one. 2018, 13 (4): 1-21

22- Chabner B.A, Chello PL, Berlino J.R. Antitumor Activity of a Folate-cleaving Enzyme, Carboxypeptidase G1. Cancer Research. 1972; 32: 2114-2119

23- Treon SP, Chabner B.A. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. Clinical Chemistry. 1996, 42 (8): 1322–1329

24- Ramsey L.B, Balis F.M, O'Brien M.M, Schmiegelow K, Pauley J.L and et al. Consensus Guideline for Use of Glucarpidase in Patients with High- Dose Methotrexate Induced Acute Kidney Injury and Delayed Methotrexate Clearance. The Oncologist. 2018, 23 (1): 52-61

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.6.6]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]