



Heterologous Expression, Purification and Determination of Activity of new Carboxypeptidase from *Cohnella* A01

Seyed Mahdi Naeemi¹, Saeed Aminzadeh^{2*}, Soyar Sari¹, Fahimeh Nemati³, Maryam naseroleslami¹

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 *chohnella* 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 *chohnella* A01 is a thermostable enzyme, after optimization, can be use it for medicinal application.

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

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



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بیان هترولوگ، خالص سازی و سنجش فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز نو ترکیب 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 زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین یا پروتئولیتیک با انجام هیدرولیز برگشت‌ناپذیر پیوند پپتیدی برای ادامه بقای موجودات زنده ضروری هستند. کربوکسی پپتیدازها از جمله آنزیم‌های پروتئولیتیکی 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 نو ترکیب 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: باتوجه به این که گلوتامات کربوکسی پپتیداز (کربوکسی پپتیداز G) دارای کاربرد دارویی است و کربوکسی پپتیداز نو ترکیب 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

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران
پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲

1 - Proteolytic

کربوکسی پپتیداز G_2 نام دارد و با نام تجاری وراکاساز^۵ 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 نسبت به 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 مواجهه با افزایش دما، غیر فعال نمی‌شوند (۱۱).

باکتری گرمادوست کوهنلا A01 از باکتری‌های بومی ایران به‌شمار می‌رود. این باکتری از خانواده پائنی باسیله^۶، گرم مثبت و میله‌ای شکل بوده، دارای ژن آنزیم گلوتامات کربوکسی پپتیداز است. در صورتی که 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 کربوکسی پپتیداز باکتری کوهنلا A01 راه‌گشا باشد. در این مطالعه ژن آنزیم گلوتامات کربوکسی پپتیداز باکتری گرمادوست کوهنلا A01 - که قبلاً در وکتور pET-26b(+) و در باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5 α 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، پلی‌اکریل آمید، آنتی بیوتیک کانامایسین، IPTG^۷ از سیگما و ایمیدازول از فلوکا خریداری شد. ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل -

(۲). کربوکسی پپتیدازها از جمله این آنزیم‌های پروتئولایتیک هستند و در اغلب بافت‌های جانوری، گیاهی، حشرات، باکتری‌ها و مخمرها مشاهده و گزارش شده‌اند (۳). امروزه کربوکسی پپتیدازها 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 کربوکسی پپتیدازهای به‌دست آمده از باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک، باعث ایجاد مزه مطلوب در گوشت فرآوری شده می‌گردد (۵). از کربوکسی پپتیداز A در کاهش میزان آکروتوکسین^۱ که از سموم هم‌خانواده مایکوتوکسین‌ها^۲ به‌شمار می‌رود استفاده شده است. این سموم که دارای قابلیت سرطان‌زایی، تراژوژنی و سمیت برای کبد هستند به‌طور غالب توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید شده و باعث آلودگی غلات و خشکبار می‌شوند (۶).

گلوتامات کربوکسی پپتیدازها 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 آکسیل 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^۳ که در شیمی درمانی بیماری سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند، جلب شد. این خصوصیت باعث می‌شد که این آنزیم از طریق تهیه‌سازی 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 کربوکسی پپتیدازی که از باکتری *سودوموناس*^۴ نژاد RS-16 به‌دست آمده است

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

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

سفرورز^۱ و ستون نمک زدایی^۲ از شرکت GE Healthcare خریداری گردید.

دستگاه‌ها

از دستگاه FPLC^۳ شرکت AKTA Purifier، دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اسپکترواستار نانو^۴ شرکت BMG و دستگاه الکتروفورز شرکت Bio-Rad استفاده شد.

نرم افزارها

از پایگاه داده‌های NCBI، Expasy و سرور آنالین Phyre^۲ استفاده شد.

بررسی‌های نرم افزاری

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 آلفاتیک و پایداری و pI آنزیم مشخص شد، هم‌چنین با استفاده سرورهای آنالین SignalP^۲ و Phyre^۲ به ترتیب وجود نواحی مشابه با پپتید نشانه^۵ در توالی آنزیم کربوکسی پپتیداز نو ترکیب باکتری کوهنلا A01 (کربوکسی پپتیداز ۳۰۲) و پیش‌بینی ساختار دوم و هم‌ترازی آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز G₂ 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 به مدت یک شبانه روز کشت داده شد. سپس به منظور 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 SDS یک درصد لیز شدند. محلول حاوی باکتری‌های لیز

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

شده در ۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. به محلول رویی به منظور حذف RNA و پروتئین‌ها به ترتیب RNase A و پروتئیناز K اضافه شد. سپس مخلوط کلروفرم و ایزوامیل به آن اضافه و در ۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. به محلول رویی ایزوپروپانول سرد اضافه شده، پس از نگهداری به مدت یک ساعت در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس، در ۸۰۰۰ g به مدت 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 تیخیر 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 به منظور انتقال پلاسمید تهیه شد. با استفاده از شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، ۱۰ میکرولیتر از پلاسمیدهای نو ترکیب 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، به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند.

انتخاب باکتری نو ترکیب مناسب

از تک کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی کاناماسین، ۳ کلنی انتخاب و به صورت جداگانه در محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کاناماسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت، به مدت 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،

دور در دقیقه تنظیم گردید. پس از ۲۴ ساعت باکتری‌ها با استفاده از سانتیفریوژ در ۸۰۰۰ g و به مدت ۱۴ دقیقه جمع-آوری 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 به صورت 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 ۱۸۰۰۰ g به مدت ۱۴ دقیقه سانتیفریوژ 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 امیدازول 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 به منظور 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 رزین 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)

پروتئین تخلیص شده، توسط ستون نمک‌زدایی و بافر Tris-

نمک‌زدایی از پروتئین تخلیص شده

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 به عنوان کنترل منفی برداشته شده، پس از سانتیفریوژ در ۶۰۰۰ و به مدت ۱۲ دقیقه، رسوب حاصل در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس بیان پروتئین با افزودن IPTG به مقدار 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 سانتیفریوژ با ۶۰۰۰ g و به مدت 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

به منظور 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 مورد نظر، 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

FPLC¹ و با استفاده از دستگاه pH:7/2) HCl 50 mM شرکت AKTA Purifier نمک زدایی شد و محلول پروتئینی جمع آوری شده برای ادامه آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲

به منظور سنجش فعالیت آنزیم، محلولی به حجم ۳۰۰ میکرولیتر شامل بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، $ZnCl_2$ ۰/۱ میلی مولار، NaCl ۵ میلی مولار و اسید فولیک ۵ میکرومولار تهیه و pH آن معادل ۷/۲ تنظیم شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کربوکسی پپتیداز (بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، $ZnCl_2$ ۰/۱ میلی مولار، NaCl ۵ میلی مولار) به محلول مذکور اضافه شد. با توجه به این که دمای بهینه رشد باکتری کوهنلا A01 حدود ۵۰ درجه سلسیوس است، هر دو محلول قبل از مخلوط شدن با یکدیگر، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ 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 به دست آمده، تغییرهای جذب به ازای هر دقیقه ($\Delta OD/min$) محاسبه شد. هر واحد (U) فعالیت آنزیم معادل کاهش غلظت اسید فولیک بر حسب میکرومول در دقیقه است. به منظور محاسبه فعالیت آنزیم از فرمول زیر استفاده شد:

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

L برابر با ۱ سانتی متر 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 $7410 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ است (۱۵).

یافته‌ها

پیش‌بینی خصوصیت‌های بیوشیمیایی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲

وزن مولکولی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ برابر با ۴۱/۶ کیلو دالتون، شاخص ناپایداری^۲ پروتئین نوترکیب مورد بررسی ۳۶/۶۴ و شاخص آلیفاتیک^۳ 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 توجه به این که کریستالوگرافی آنزیم مذکور منتشر نشده است، از زنجیره A آنزیم کربوکسی پپتیداز G₂ 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

بر اساس 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 فیلوژنتیک 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 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 به دست آمده از استوک کلنی مذکور انجام شده است.

2 - Aliphatic index

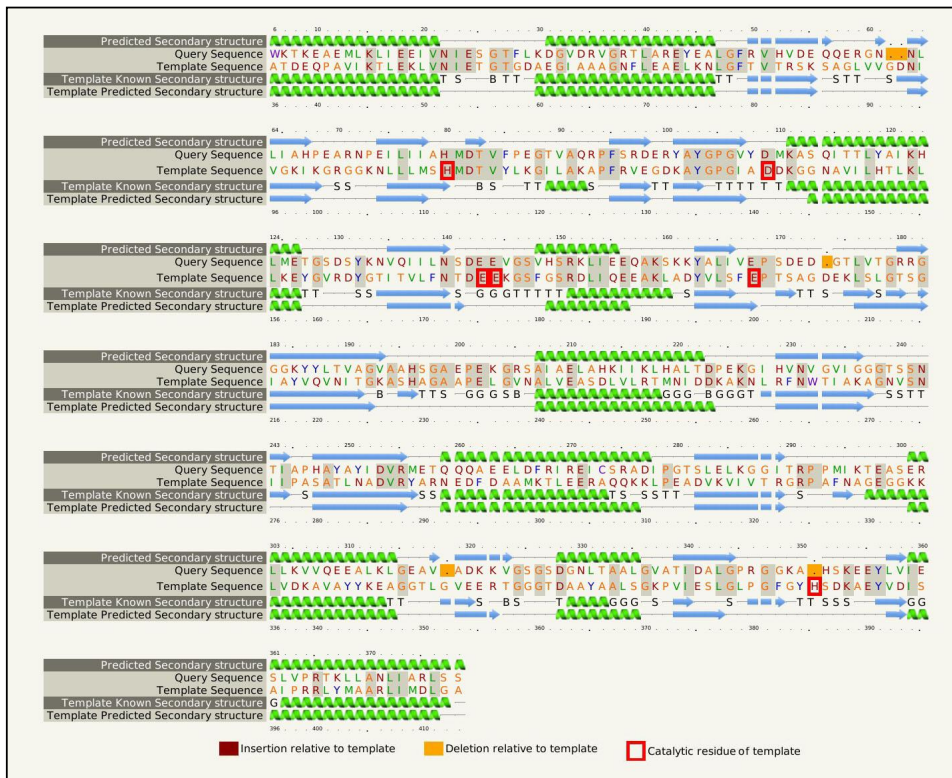
1 - Instability index

4 - Super Family

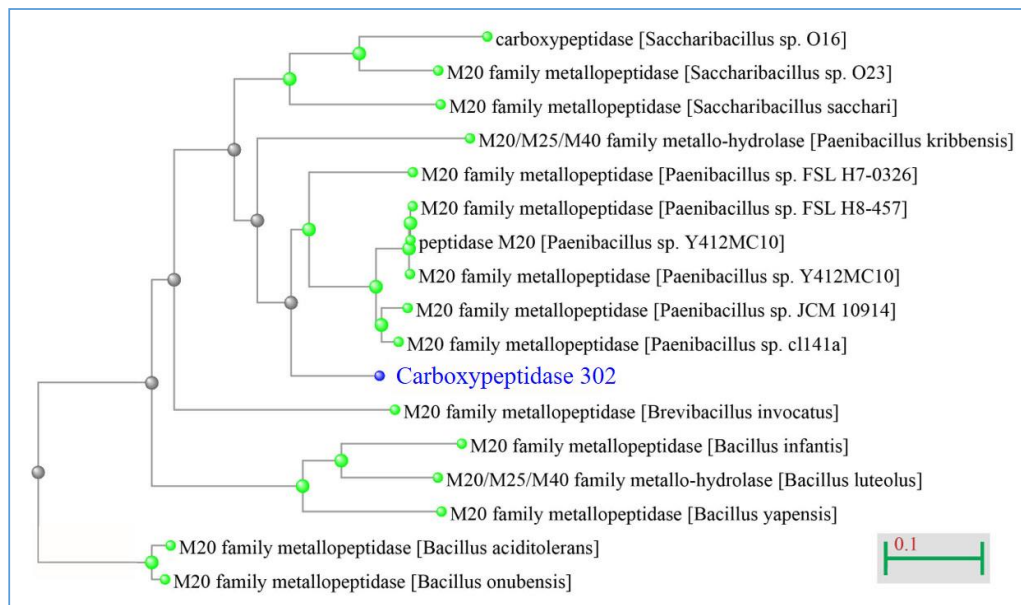
1 - Fast protein liquid chromatography



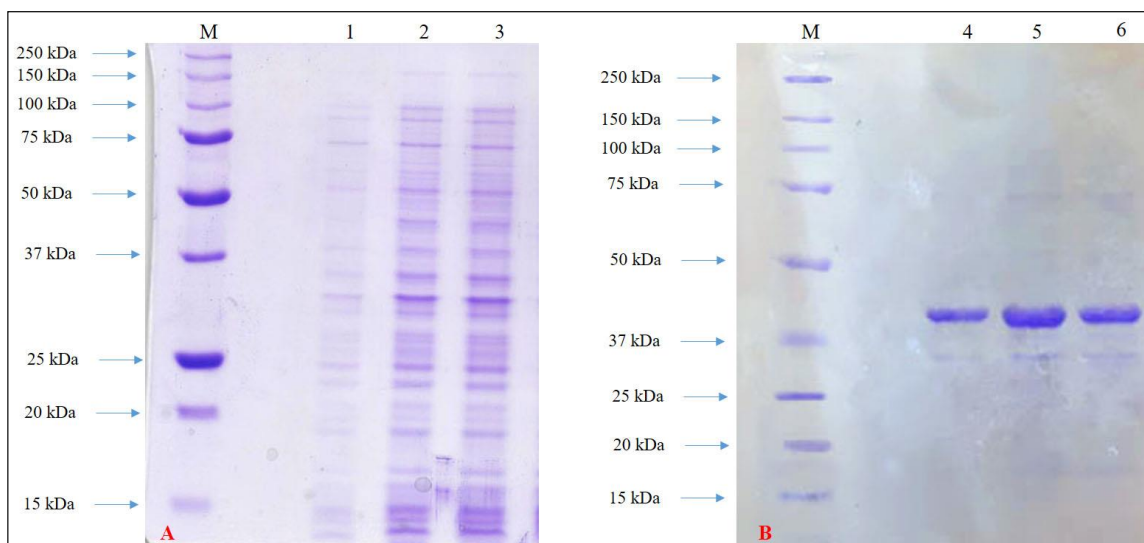
شکل ۱- ساختار دوم پیش‌بینی شده توسط سایت Phyre² برای آنزیم کربوکسی پپتیداز نو ترکیب باکتری کوهنلا A01، ریشه اسیدآمینه‌های مشخص شده با رنگ قرمز نشان‌دهنده مناطق دارای احتمال بالای اطمینان و ریشه‌های مشخص شده با رنگ آبی تیره، مناطق دارای احتمال اطمینان ضعیف هستند.



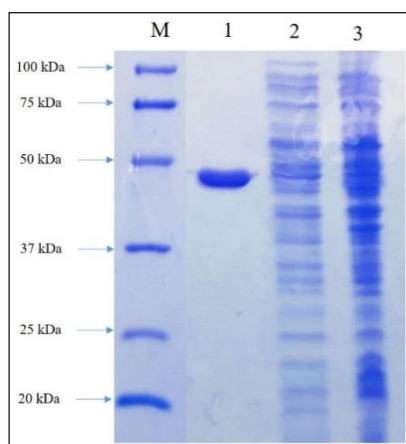
شکل ۲- هم ترازای پیش بینی ساختار دوم آنزیم کربوکسی پپتیداز نو ترکیب باکتری کوهنلا A01 با زنجیره A آنزیم کربوکسی پپتیداز G₂ باکتری سودوموناس نژاد RS-16. نواحی اضافه شده و حذف شده نسبت به توالی الگو به ترتیب با رنگ قرمز تیره و نارنجی مشخص شده است. ریشه اسید آمینه های تشکیل دهنده ناحیه فعال آنزیم الگو، با کادر قرمز رنگ مشخص شده اند.



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



شکل ۴- تصویر A: ستون M شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون های ۱ الی ۳ به ترتیب کلنی های ۱ تا ۳ قبل از القا توسط IPTG. تصویر B: ستون M شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون های ۴ الی ۶ به ترتیب کلنی های ۱ تا ۳، بیست و چهار ساعت پس از القا توسط IPTG.



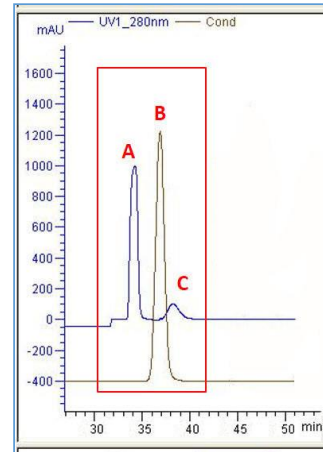
شکل ۵- تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل - سفاروز. ستون M: شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون ۱: پروتئین تخلیص شده. ستون ۲: محلول جمع آوری شده پس از شستشو با بافر شستشو. ستون ۳: محلول حاصل از لیز شدن باکتری ها، پس از عبور از ستون نیکل - سفاروز

بیان و خالص سازی پروتئین

با استفاده از IPTG بیان پروتئین القا شد، به دلیل استفاده از وکتور pET26b(+) پروتئین نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی است. با استفاده از ستون حاوی رزین نیکل - سفاروز خالص سازی 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).

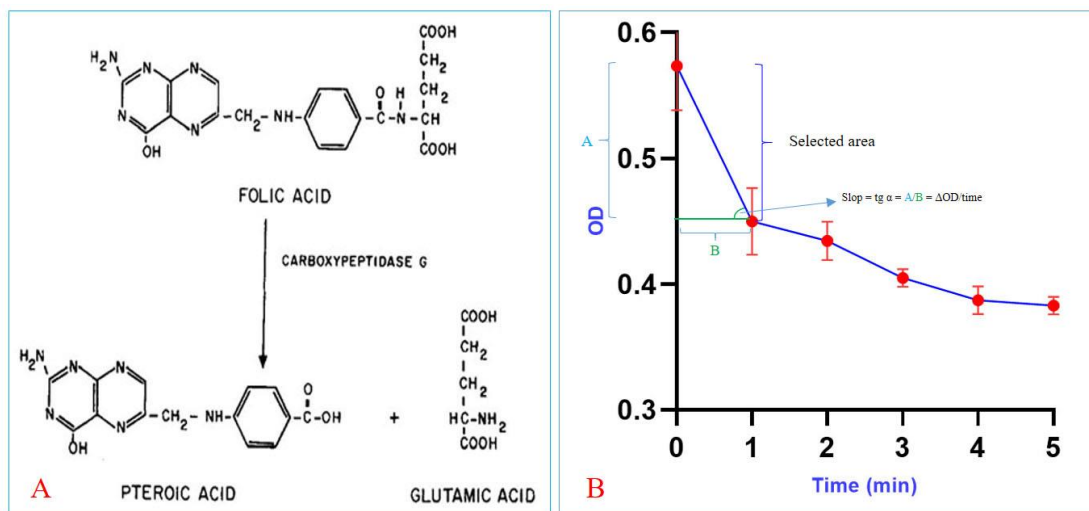
نمک زدایی از پروتئین تخلیص شده

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



شکل ۶- نمک زدایی از پروتئین خالص شده با استفاده از دستگاه FPLC: کادر قرمز رنگ نشان دهنده اولین تزریق به دستگاه است. پیک آبی رنگ A نشان دهنده خروج پروتئین نو ترکیب از ستون نمک زدایی، پیک قهوه ای رنگ B نشان دهنده 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 نشان دهنده تجزیه اسید فولیک به پتروئیک اسید و اسید گلوتامیک است. فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ معادل ۱۷۹ U/ml محاسبه شده است. همان طور که در شکل ۷-A مشاهده می شود فولیک اسید توسط آنزیم کربوکسی پپتیداز G به پتروئیک اسید و گلوتامات تجزیه می شود 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 به علت کاهش غلظت سوبسترا، شیب تغییرات جذب کاهش شدید پیدا کرده است و بنا براین در محاسبه فعالیت منظور نشده است.

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 اسید آمینه کم تر دارد ولی همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می شود در درصد ساختارهای مارپیچ آلفا، صفحات بتا، لوپ و

بحث

آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ از ۳۸۲ ریشه اسید آمینه و آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 (آنزیم الگو) از ۳۹۳ ریشه اسید آمینه تشکیل شده است. هر دو آنزیم دارای قرابت نزدیک با خانواده

و ۱۴۰ الی ۱۶۹ آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ به ترتیب حدود ۵۲ و ۵۹ درصد است. از سوی دیگر از شش ریشه اسیدآمینوهای تشکیل دهنده ناحیه فعال کربوکسی پپتیداز G_2 محل قرار گرفتن و نوع اسیدآمینو در پنج ریشه اسیدآمینو آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ مطابقت داشته، در مورد اسیدآمینو ششم نیز فقط شیفتی به اندازه یک ریشه اسیدآمینو مشاهده می‌گردد و نوع اسیدآمینوها یکسان است و به احتمال در آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ نیز ریشه اسیدآمینوهای Asp109, His80, Glu143, Glu144, His152 و Glu168 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 اسیدآمینو	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)

باکتری‌هایی که آنزیم در آنها بیان شده است را در دمای منفی بیست الی منفی هشتاد درجه سلسیوس فراهم می‌کند.

از آنجایی که 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 توجه به 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، علاوه بر افزایش نیمه‌عمر آنزیم، موجب سهولت تولید، تخلیص، نگهداری و استفاده شده، در برخی از موارد افزایش تنوع کاربرد را نیز به دنبال خواهد داشت. شاخص آلیفاتیک، نشان‌دهنده میزان حضور اسیدآمینوهای آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین در پروتئین است، این اسیدهای

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 اسیدآمینو شماره ۶ کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ و ریشه اسیدآمینو شماره ۳۶ آنزیم الگو آغاز شده - قابل ذکر است که ۲۲ ریشه اسیدآمینو از سمت انتهای آمینی آنزیم الگو، پپتید نشانده بوده و در هم‌ترازی لحاظ نشده است- و بیش‌ترین همسانی در اسیدآمینوهای مشاهده می‌گردد که در اطراف اسیدآمینوهای تشکیل دهنده جایگاه فعال آنزیم الگو قرار دارند به طوری که این همسانی در نواحی بین ریشه اسیدآمینوهای ۸۰ الی ۱۱۱

سیستم بیانی pET یکی از سیستم‌های بیانی قوی است که برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب در پروکاریوت‌ها به کار می‌رود، با توجه به این که ژن کربوکسی پپتیداز کوهنلا A01 قبلا در باکتری *اشرشیاکلی* سویه DH5 α و در داخل وکتور (+)pET26b قرار داده شده بود (۱۲)؛ باکتری *اشرشیاکلی* سویه BL21 به عنوان 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 مورد نظر 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 ترشچی وجود ندارد. البته در صنعت داروسازی برای تولید آنزیم کربوکسی پپتیداز G_2 از پپتید نشانده استفاده شده است تا فرآیند تولید آن با سهولت بیش‌تری همراه گردد. باقی ماندن آنزیم نو ترکیب کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ پس از بیان در داخل سلول (در مقیاس آزمایشگاهی) دارای مزیت است به طوری که این مسأله هر چند مرحله شکستن سلول را به فرآیند تخلیص پروتئین اضافه می‌کند، اما مانع از تجزیه پروتئین نو ترکیب در محیط -توسط پروتئازهایی که از سلول‌های مرده رها می‌شوند - شده، از سوی دیگر امکان نگهداری طولانی مدت

آمیننه دارای زنجیره جانبی آبگریز هستند و هر چه مقدار این اسیدهای آمینه در پروتئینی بیش تر باشد مقاومت گرمایی آن پروتئین افزایش خواهد یافت (۱۸). آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ با شاخص آلیفاتیک ۹۴/۰۱ دارای مقاومت گرمایی است. البته با توجه به این که باکتری کوهنلا A01 از باکتری های گرمادوست به شمار می رود، وجود درصد بالایی از اسیدهای آمینه آبگریز و در نتیجه مقاومت گرمایی در آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ مورد انتظار بود.

با توجه به این که دمای بهینه رشد باکتری کوهنلا A01 حدود ۵۰ درجه سلسیوس است، به منظور 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 G₂ یک متالوکربوکسی پپتیداز وابسته به روی است به نحوی که 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 نمی دهد (جدول ۳).

همانند کربوکسی پپتیداز G₂ که می تواند ریشه گلوتامات را از متوترکسات جدا کند (۱۹) کربوکسی پپتیداز G استخراج شده از باکتری *Xenophilus azovorans* SN213 با نام کربوکسی پپتیداز Xen G₂ نیز قادر به این کار است (۲۰). هم چنین نوع دیگری از آنزیم کربوکسی پپتیداز G قادر است علاوه بر ریشه گلوتامات، ریشه اسپارات را نیز از انتهای کربوکسیل زنجیره پپتیدی جدا نماید و با نام کربوکسی پپتیداز G₃ معرفی شده است (۲۱). برخی از خصوصیت های بیوشیمیایی آنزیم کربوکسی پپتیداز ۳۰۲ در مقایسه با کربوکسی پپتیدازهای G₂ و G₃ در جدول ۳ نشان داده شده اند.

جدول ۳: مقایسه برخی از خصوصیت های بیوشیمیایی آنزیم های کربوکسی پپتیدازهای ۳۰۲، G₂ و G₃

مرجع	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	سوبسترا	کوفاکتور	pI	وزن مولکولی (kDa)	فعالیت آنزیم (U/ml)	کربوکسی پپتیداز
این مطالعه	۳۶/۶۴	۹۴/۰۱	فولات	روی	۵/۷۵	۴۱/۶۰	۱۷۹	۳۰۲
(۱۳)	-	-	فولات	روی	-	۴۶	۱/۲۲	G ₁
(۱۹)	۲۵/۳۳	۹۳/۱۸	فولات	روی	۷/۸	۴۱/۸۰	۲۸۱	G ₂
(۲۰)	-	-	متوترکسات	روی	-	۴۱/۷۶	۲۴/۳	Xen G ₂
(۲۱)	-	-	پلی گلوتامات پلی اسپارات	روی، کلسیم	۶/۲۲	۶۰	۲۶/۷	G ₃

نتیجه گیری

فولات ها به عنوان کوآنزیم در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی از جمله سنتز DNA نقش دارند. بنابراین استفاده از یک سیستم کاهنده فولات باعث توقف رشد سلول های سرطانی خواهد شد (۲۲). در حال حاضر در صنایع دارویی از آنتاگونیست های فولات مانند متوترکسات، لوکورین و ۵ متیل تترا هیدروفولیک اسید به عنوان موادی که در رقابت با اسید فولیک موجب مهار آنزیم تترا هیدرو فولات ردوکتاز - که نقش اساسی در سنتز پورین ها و پریمیدین ها دارد- می شوند، در درمان برخی از سرطان ها استفاده می گردد. متوترکسات

یکی از داروهایی است که به وفور برای جلوگیری از رشد سریع سلول های سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۳). متأسفانه افزایش سطح سرمی متوترکسات در بیماران که با استفاده از این دارو تحت درمان قرار می گیرند، در دراز مدت به نارسایی کبد و کلیه می انجامد. از این رو استفاده از دارویی که قادر به تجزیه متوترکسات به مواد بی ضرر باشد، ضروری خواهد بود. در حال حاضر آنزیم کربوکسی پپتیداز G₂ که از باکتری *Sordomonas* نژاد RS-16 تهیه شده است با نام تجاری Voraxaze برای کاهش سطح سرمی متوترکسات مورد استفاده قرار می گیرد که دمای نگهداری مناسب آن ۸-۲ درجه سلسیوس است (۲۴). ولی آنزیم هایی که از

میکروارگانیسم های گرمادوست تهیه می شوند دارای پایداری حرارتی مناسبی هستند. از این رو، با توجه به این که کربوکسی پپتیداز نو ترکیب باکتری کوهنلا A01 قادر به تجزیه فولات است، بررسی های بیش تر در خصوص تعیین ساختار، خصوصیت های بیوشیمیایی و سینتیکی، توانایی تجزیه متوترکسات و مقایسه کارایی آن با آنزیم کربوکسی پپتیداز G₂ می تواند امکان بهینه سازی و استفاده از این آنزیم را در صنایع دارویی مشخص سازد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از بخشی از نتایج پایان نامه دکتری زیست-شناسی سلولی و مولکولی دانشکده علوم نوین دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران است که با کد ۲۲۵۳۰۵۵۴۹۷۲۰۲۱ در این دانشگاه به ثبت رسیده است. هم چنین از آقای مصطفی حاج هادی که مراحل کلونینگ این ژن را برعهده داشته اند و از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که امکان این پژوهش را فراهم نمودند، کمال تشکر را داریم.

- 1- Gomis X, Ruth F. Structure and Mechanism of Metallocoxy-peptidases. 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- Ceruti R.J, Pirola M.B, Ramos E, Robert L, Rubiolo A.C, Sihufe G.A. Use of an Exogenous Carboxypeptidase to Accelerate Proteolysis in Reggiano 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 G₂, 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 G₂ 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 G₁. 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

- 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 G₂ 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 G₃. *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

