



مقاله علمی - پژوهشی

تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نو ترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مهسا ضابطیان^۱، محمدرضا نصیری^{۲*}، علی جوادمش^۳، شاهرخ قوتی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

ضابطیان، م.، م. ر. نصیری، ع. جوادمش، و ش. قوتی. ۱۴۰۰. تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نو ترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۴۰-۴۲۹.

چکیده

همان‌طور که تحقیقات گوناگون نشان داده‌اند، در سال‌های اخیر، میزان مرگ‌ومیر بر اثر سرطان رشد چشمگیری داشته است؛ به همین دلیل است که محققان در پی تولید داروهای جدید، به ویژه داروهایی با اثرات جانبی کمتر، هستند. بر همین اساس، آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند نیز یکی از بهترین اورتولوگ‌ها برای آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاو است که آن را در القای مرگ سلول‌های سرطانی به کار می‌گیرند. آنزیم گوسفندی تنها در ۴ اسید آمینه A19S، K37Q، V46F و N103E با آنزیم گاو تفاوت دارد. در مطالعه پیش‌رو، ابتدا شکل سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند پیش‌بینی و سپس از نظر پایداری بررسی شد. در ادامه، مشخصات فیزیکی شیمیایی این آنزیم با برنامه پرات پارام نیز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی شبیه‌سازی و باتوجه به RMSD، RMSF و Gyration analyses میزان پایداری پروتئین نیز پیش‌بینی گردید. مطالعات آزمايشگاهی نیز از قبیل بررسی فرار این آنزیم از RI، میزان مقاومت آن در مقابل پیپسین، غلظت پروتئین تولیدی، قابلیت القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی و نیز میزان فعالیت این آنزیم، انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در مجاورت پیپسین تا ۹۰٪ دست‌نخورده باقی می‌ماند. میزان غلظت پروتئین تولیدی نیز 4.78 mg/ml بود که با استفاده از روش برادفورد تخمین زده شد. در این مطالعه فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 558±22 U/mol برآورد شد. همان‌طور که در تحقیقات گذشته نشان داده شده است، انواع RNaseA گاو و گوسفند نمی‌توانند وارد سلول شوند و در نتیجه هیچ‌گونه سمیت سلولی نشان نمی‌دهند، ولی در این مطالعه با استفاده از لپئوفکتامین، این آنزیم‌ها وارد سلول شدند و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی Hella القا کردند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها نیز به روش MTT assay اندازه‌گیری شد. بر اساس این تحقیق، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی فعالیت آنزیمی و توکسیتی مشابهی با آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاو دارد و برای استفاده به عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها جانشین مناسبی است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، بیوانفورماتیک، سمیت سلولی، فعالیت زیستی.

مقدمه

تخریب RNA می‌کنند) و اندونوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرزهایی که از درون اقدام به تخریب RNA می‌کنند) جای می‌گیرند. دسته‌ای اخیر تحت‌عنوان ریبونوکلئازها یا به اختصار RNaseها شناخته می‌شوند (۲۲). آنزیم‌های ریبونوکلئاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که با شکستن

آنزیم‌های RNase بر اساس نحوه تخریب RNA در دو دسته‌ای از نوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرزهایی که از انتها شروع به

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.
۳- نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.
DOI: 10.22067/ijasr.2020.38319.0

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

در این جایگاه قرار گرفته‌اند. این اسید آمینه‌ها عمل کاتالیز آنزیم را انجام می‌دهند. اسید آمینه ۳۴ نیز گلیکولیزه است (۳۲). علی‌رغم تمام موانع پیش‌رو، یک ویژگی خاص در RNase A سبب شده است که تحقیقات درباره آن آنزیم به‌عنوان یک ایمونوریپونوکلئاز امیدبخش همچنان ادامه داشته باشد. این ویژگی نبود گیرنده سطح سلولی برای این آنزیم در بدن است که آن را از ایمونوتوکسین‌های مشابه متمایز می‌کند (۲۳).

تاکنون، شرکت‌های تجاری بسیاری موفق به تولید آنزیم ریپونوکلئاز پانکراس گاوی شده‌اند. اما، در میان گونه‌های نشخوارکننده، گوسفندان را نیز می‌توان به‌عنوان یک گونه مناسب برای تولید این آنزیم مدنظر قرار داد. با توجه به ظرفیت نژادی گوسفند در ایران، به نظر می‌رسد که ما از طریق مطالعات مولکولی و فیلوژنیک ژن مربوط به آنزیم پانکراس گوسفندی بتوانیم زمینه را برای بررسی‌های بیشتر و تولید یک پروتئین نو ترکیب در آینده فراهم سازیم. نظر به اینکه مشاهده بررسی‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که برای بهبود اثرات مرگ سلولی این آنزیم هنوز اصلاحاتی در آن ایجاد نشده است، هدف از این پژوهش بررسی همین موضوع است.

مواد و روش

پیش‌بینی شکل سه‌بعدی

در ابتدا، شکل سه‌بعدی آنزیم مدنظر از سایت <http://www.rcsb.org/> به شماره 10.2210/pdb1YV6/pdb، ثبت شده است به نام آنزیم طبیعی ریپونوکلئاز گاوی RNase A گوسفندی، شکل سه‌بعدی آنزیم RNase A گوسفندی با استفاده از این اطلاعات پیش‌بینی شد؛ سپس، این ساختار سه‌بعدی ریپونوکلئاز پانکراس گوسفندی نیز به وسیله نرم‌افزار I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) پیش‌بینی گردید. در ادامه، صحت ساختار پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار SAVESv5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) سنجیده شد. بدین ترتیب که ابتدا شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شده به وسیله پلات رامچاندرا بررسی و برای انجام دادن اصلاحات شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شده‌ی اولیه به نرم‌افزار گلمکسی به آدرس <http://galaxy.seoklab.org/refine> فرستاده شد و نتیجه دوباره به وسیله پلات رامچاندرا بررسی گردید (۱۱).

همچنین، خواص فیزیکی شیمیایی آنزیم ریپونوکلئاز گاو و گوسفند نیز به کمک سایت پرات پارام (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی گردید. در انتها، به وسیله نرم‌افزار SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) شکل سه‌بعدی آنزیم

پیوند فسفودی‌استر بین نوکلئوتیدها موجب تجزیه آن‌ها می‌شوند. این ویژگی این آنزیم‌ها باعث می‌شود که در آزمایشگاه‌های زیستی کارکردهای متنوع و متعددی داشته باشند، از جمله برای استخراج DNA، آنالیز توالی RNA و نقشه‌یابی RNA، و به‌عنوان نشانگر وزنی مولکولی؛ بنابراین، تولید تجاری آنزیم‌های ریپونوکلئاز اهمیت فراوانی دارد (۶).

آنزیم‌های RNase در اکثر موجودات زنده وجود دارند، اما در نشخوارکنندگان، به دلیل سیستم گوارشی منحصربه‌فرد این جانداران، بیشتر تولید می‌شوند (۳). به‌طور کلی، این آنزیم‌ها در نشخوارکنندگان سه همولوگ دارند که به ترتیب عبارت‌اند از همولوگ مغزی، همولوگ سمینال و همولوگ پانکراسی (۴). با توجه به اینکه دستگاه گوارش نشخوارکنندگان وابسته به تخمیر میکروبی است و این مکانیسم سبب تولید حجم زیادی از پروتئین‌ها، DNA و RNA میکروبی می‌شود، نشخوارکنندگان برای هضم این فرآورده‌های تخمیری نیازمند تولید حجم بیشتری از آنزیم‌های تجزیه‌کننده این ترکیبات هستند که درباره RNase این موضوع ثابت شده است؛ مشاهده نشان داده‌اند که سلول‌های برون‌ریز پانکراس این موجودات حجم بسیاری از آنزیم‌های RNase تولید می‌کنند (۶) که آن‌ها را، بر اساس میزان تولید، به ترتیب RNase A، B، C و D نامیده‌اند. در این بین، RNase A شناخته شده تر است (۳).

اولین بار، در سال ۱۹۴۰ آنزیم RNase پانکراتیک از پانکراس گاو به دست آمد؛ بعد از آن، استخراج این آنزیم از حیواناتی مانند گوسفند، موش، خوک، اسب و بز نیز صورت گرفت (۵). در سال‌های بعد، از RNase پانکراس گاوی همچنین به‌عنوان مدلی برای بررسی پیچ خوردگی پروتئین‌ها، کسب اطلاعات درباره باندهای دی‌سولفیدی و همچنین مطالعات کریستالوگرافی استفاده کردند. امروزه، این آنزیم به عنوان یک عامل القاکننده مرگ سلولی نیز شناخته می‌شود که این کار را با از بین بردن RNA سلولی انجام می‌دهد (۵، ۳۰). از میان تمام RNase‌های شناخته شده، فعالیت آنزیمی RNase A یا همان آنزیم پانکراس گاوی بیشتر گزارش شده است. بر اساس مطالعات، میزان فعالیت آنزیمی RNase پانکراتیک گوسفندی برابر با رتولوگ^۱ گاوی آن است (۱۲)، اما مطالعات چندانی درباره این آنزیم که آن را به نام RNase A گوسفند می‌شناسیم صورت نگرفته است.

آنزیم RNase A گوسفند ۱۲۴ آمینو اسید دارد، وزن مولکولی آن در حدود ۱۳/۷۱ دالتون است، و در ساختار خود ۴ باند دی‌سولفیدی بین سیستم‌های شماره ۲۶ با ۸۴، ۴۰ با ۹۵، ۵۸ با ۱۱۰ و ۶۵ با ۷۲ دارد. جایگاه اتصال RNase A در اسید آمینه‌های ۷، ۱۰، ۶۶ و ۸۵ است. شکل ظاهری آن نیز شبیه لوبیاست که جایگاه فعال این آنزیم در ناف لوبیا قرار دارد. دو اسید آمینه هیستیدین ۱۲ و هیستیدین ۱۱۹

تولید را دارد؛ به همین دلیل، نمونه به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و سپس برای جمع‌آوری سلول‌ها در سانتریفیوژ با سرعت 12000 g در ۴ درجه انجام و محلول بالایی خارج شد. سلول‌ها برای بررسی اولیه با الکتروفورز (SDS-PAGE^۵) تأیید شدند.

تخلیص پروتئین

به دلیل وجود سیگنال پپتید PeIB در توالی مدنظر بیان پروتئین در فضای پری پلاسمیک صورت گرفته بود که از همین روی برای خالص سازی پروتئین می‌بایست از روش شوک اسموتیک استفاده می‌شد (۱۱).

درانتها، به منظور القا به داخل سلول‌ها بافر هایپرتونیک (Tris- (Hcl 30mM, EDTA 1 mM, Saccharose 20%, pH=8) به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر به محلول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 8000 سانتریفیوژ شد و محلول بالایی از آن جمع‌آوری گشت. پلت به دست آمده در 25 ml 5 mM MgSO₄ hypotonic به صورت محلول به دست آمد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 8000 سانتریفیوژ شد. در نهایت، محلول بالای به دست آمده جمع‌آوری شد و به مدت ۱۶ ساعت در محلول لایزیز (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH: 8.0) قرار گرفت.

به منظور تخلیص پروتئین از ستون Q-sepharose استفاده شد. ابتدا، ستون سه مرتبه با محلول پروتئین مدنظر شست‌وشو داده شد و ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی که شامل پروتئین می‌بود در دمای ۴ درجه از طریق ستون فیلتر شد. بعد از این مرحله، پروتئین مدنظر با غلظت‌های مختلف محلول نمکی NaCl 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2, 3 مولار از ستون شست‌وشو داده شد. محلول‌های حاصل از فیلتر کردن ستون به وسیله غلظت‌های مختلف نمکی جمع‌آوری شد و بر روی ژل SDS-PAGE وجود پروتئین مدنظر در این محلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت تا مناسب‌ترین غلظت محلول نمکی که شامل پروتئین مورد نظر بود به دست بیاید. درانتها، غلظت پروتئین استخراج شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید (۱۴).

بررسی فعالیت RNase

بررسی فعالیت آنزیمی RNase A گوسفندی طبیعی با روش تری پاتی و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت (۲۶). در ابتدا، RNA مخمر با

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی هم تأیید شد. ساختار RNase A پیش‌بینی شده برای شبیه‌سازی در برنامه گرومکس (ver 5) Gromacs (software Linux (ver 17) با استفاده از فورس‌فیلد CHARM (ver 17) بررسی گردید. مولکول مدنظر در یک مکعب که درون آن ۵۹۲۲ مولکول آب قرار گرفته بود در pH طبیعی بدن از طریق اضافه کردن ۸ مولکول کلر در فاصله ۷ آنگسترومی پروتئین مدنظر قرار گرفت. بهینه سازی انرژی در ۳۰۰ درجه کلین انجام شد. شبیه‌سازی MD^۱ میزان پایداری پروتئین را از ۱ درجه تا ۳۰۰ درجه کلین و در ۴۰ نانوثانیه بررسی کرد که در این بررسی مقادیر $rmsd^2$, $rmsf^3$ و Rg^4 به دست آمد.

تهیه سازه‌های لازم برای تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس در باکتری ایکولای BL21

در ابتدا، توالی پروتئین مدنظر با کمک نرم‌افزار clc به صورت مجازی در داخل ناقل pET21b قرار گرفت. به دلیل انتخاب سایت‌های برشی *HindIII XbaI* که مانع عملکرد سیگنال پپتاید PeIB leader موجود در وکتور می‌شوند، سیگنال پپتاید PeIB leader به منظور بیان پروتئین در فضای پری پلاسمیک به ساختار مدنظر اضافه شد. سپس، ساختار طراحی شده توسط شرکت Shanghai, GenRay (China) به منظور بیان در ایکولای و بهینه سازی کدون به کار گرفته شد و توالی از طریق این شرکت سنتز شد. ابتدا، ساب‌کلون توالی در داخل وکتور pGH و سپس در درون وکتور pET21b بین دو آنزیم برشی *HindIII* و *XbaI* کلون شد. انتقال وکتور pET21b به همراه توالی مدنظر به داخل میزبان بیان BL21(DE3) به منظور تولید پروتئین مدنظر انجام گرفت. سپس، به وسیله کلونی PCR، انتقال وکتور تأیید شد که در نهایت کلونی مدنظر برای بیان در باکتری ایکولای نیز تأیید گرفت.

بعد از این مرحله، در محیط کشت LB، سلول‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به صورت متحرک، با سرعت 180 rpm، کشت داده شدند. درانتها، ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به ۲ لیتر محیط کشت LB که شامل 100 µg/ml ampicillin بود اضافه و کشت داده شد تا محیط کشت به غلظت مدنظر (OD 600) برسد.

همچنین، به منظور بیان پروتئین به مقدار 1.5 mM از D-1 isopropyl β-thiogalactoside (IPTG) نیز به محیط کشت اضافه شد. ابتدا، نمونه‌گیری به منظور بهینه‌سازی زمان تولید به صورت ساعتی انجام گرفت که در نتیجه آن معلوم شد ساعت پنجم بیشترین میزان

4- gyration radius
5- Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

1- Molecular dynamics
2- Root mean square deviations
3- root mean-square fluctuation

گوسفندی با پلات رامچاندرا، قبل و بعد از اصلاحات اولیه، شکل سه بعدی پیش‌بینی شده را تأیید می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تمرکز اسیدهای آمینه در ناحیه پایدار افزایش یافته است و حدود ۹۸٫۴٪ از آن‌ها در قسمت‌های قرمز رنگ و آبی‌رنگ که ناحیه پایدار است متمرکز شده است (۱۵).

مقایسه ساختار سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی و گاوی نشان داده است که باوجود ۴ جهشی که در آنزیم گاوی نسبت به نوع گوسفندی در جایگاه‌های A19S، K37Q، V46F و N103E وجود دارد، این امر هیچ تأثیری بر روی گرایش و شکل سه بعدی آنزیم گوسفندی نگذاشته است و هر دو آنزیم کاملاً شبیه هم هستند (شکل ۲). همچنین، هر دو آن‌ها کاملاً با آنزیم RI براساس داده‌های بیوانفورماتیکی مهار می‌شوند. میزان شباهت این دو آنزیم به یکدیگر در حدود ۹۹٫۷۷٪ است (۳).

همان‌طور که بیان شد، طی این تحقیق، مطالعات و بررسی‌های آنزیمی هم درباره آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند صورت گرفت. این مطالعات بیوانفورماتیکی نشان داد که تفاوت در ۴ آمینواسید تأثیری بر نحوه اتصال به RI ندارد؛ با این حال، از آنجاکه بنابه نظر محققان این‌گونه مطالعات به یک شاهد تأیید شده نیاز دارد، به این منظور از داده‌های کریستالوگرافی آنزیم گاوی برای بررسی‌های بیشتر و افزایش قابلیت اطمینان استفاده شد. این داده‌ها نشان از درست بودن اطلاعات آنزیم گوسفندی داشت (شکل ۳) که البته این نتایج از طریق شبیه‌سازی^۲ MDS نیز تأیید شدند (شکل ۴) (۳۵).

تولید آنزیم طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مطالعات نشان داده‌اند که وجود سیگنال پیتاید PeIB باعث تولید پروتئین در فضای پری‌پلاسمیک می‌شود که فضای مناسب‌تر و خلوت‌تری نسبت به فضای سیتوپلاسمیک دارد (۱۲، ۲۴). ژن RNase A که ۳۶۹ جفت باز دارد و بین ۲ سایت برشی *HindIII* و *XbaI* قرار گرفته است به وسیله هضم دوتایی در داخل کلونینگ سایت pET-21b قرار می‌گیرد. طی این تحقیق، با استفاده از کیت اتصال، توالی مدنظر به داخل *E. coli* BL21 (DE3) انتقال داده شد و سپس از طریق کلونی PCR انتقال سازه تأیید شد (شکل ۵). تولید پروتئین طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند به اندازه ۱۳٫۷ کیلودالتون هم با SDS-PAGE تأیید شد. تخلیص این پروتئین به وسیله شوک اسمزی و ستون Q-Sepharose انجام گرفت و سپس از طریق الکتروفورز تأیید شد (شکل ۶). این مطالعات از تولید پروتئین به صورت کامل در سلول‌های مدنظر و فضای سیتوپلاسمی حکایت داشتند. با کمک روش برادفورد میزان غلظت پروتئین طبیعی تولیدشده نیز ۴٫۷۸ mg/ml برآورد شد.

فعالیت آنزیمی و مقاومت در برابر پیپسین

محلول اتیديوم بروماید مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد؛ سپس، ۲ میکرولیتر از ریبونوکلئاز با غلظت ۲ میکرومول به آن اضافه شد و تغییرات غلظت فلورسنت آن به مدت ۳۰۰ ثانیه و در طول موج ۵۱۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۶). این آزمایش، همچنین، با غلظت مختلف از (Thermo, USA) RNase inhibitor (RI) نیز انجام گرفت (۱۹، ۲۰).

مقاومت در مقابل پروتئازها

ریبونوکلئاز RNase A با غلظت 0.2 mg/mL پیپسین به آنزیم به نسبت ۱ به ۲ در دمای ۳۷ درجه و در داخل محلول 50 mM glycine-HCl در PH 2.4 قرار گرفت. از یک آنزیم تجاری ریبونوکلئاز (Qiagen, USA) به‌عنوان شاهد در این آزمایش استفاده شد. در زمان‌های مشخصی نمونه‌گیری انجام گرفت و همچنین به منظور تنظیم PH نمونه از محلول ۲ مولار تریس استفاده شد که در نهایت به وسیله SDS-PAGE بررسی گردید (۲۹).

آزمون MTT

به‌منظور بررسی فعالیت ضدسرطانی آنزیم مدنظر، رده سلولی سرطانی Hella آماده برای کشت در داخل پلیت ۹۶ خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۷٪ به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و سپس برای اطمینان یافتن از زنده بودن سلول‌ها ر شد و حرکت آن‌ها بررسی گردید. بعد از این، اثر افزودن آنزیم ریبونوکلئاز بر این رده سلولی در ۷ غلظت مختلف (2000 ng، 2500 ng، 3000 ng، 1500 ng، 1000 ng، 500 ng، 100 ng) با ۳ تکرار آزمایش شد و همچنین IC50 نیز محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلول 20 ml از محلول^۱ MTT با غلظت 5 mg/ml که با PBC رقیق شده بود به پلیت‌ها اضافه شد.

نتایج

مقایسه خصوصیات فیزیوشیمیایی

در این مطالعه، خواص فیزیوشیمیایی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس در گاو و گوسفند توسط نرم‌افزار پرات پرام (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی و مقایسه شد (جدول ۱).

بررسی‌های بیوانفورماتیکی ساختار آنزیم ریبونوکلئاز

پانکراس گوسفند

بررسی‌های شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شده ریبونوکلئاز پانکراس

2- Molecular dynamics simulation

1- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

سلولی Hella

به منظور بررسی میزان سیتوکسییتی RNase از روش MTT assay استفاده شد و همچنین RNase A گاو به عنوان شاهد مدنظر قرار گرفت. در آغاز (شکل ۷)، در حضور آنزیم RNase A گاو و گوسفند، این آنزیم‌ها وارد سلول نشدند و در نتیجه هیچ فعالیت سیتوتوکسییتی نشان ندادند، ولی پس از تیمار با لیپوفکتامین ۳۰۰۰ (Thermo, USA) براساس روش ارائه شده سلر و همکاران در سال ۱۹۹۵- این تحقیقات در سال ۲۰۱۴ بازبینی شد- آنزیم مدنظر وارد سلول‌ها شد (۲۵). بعد از ورود آنزیم‌ها به سلول‌ها، مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی Hella القا شد. سپس، با بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها میزان فعالیت سیتوکسییتی آنزیم نیز اندازه‌گیری شد.

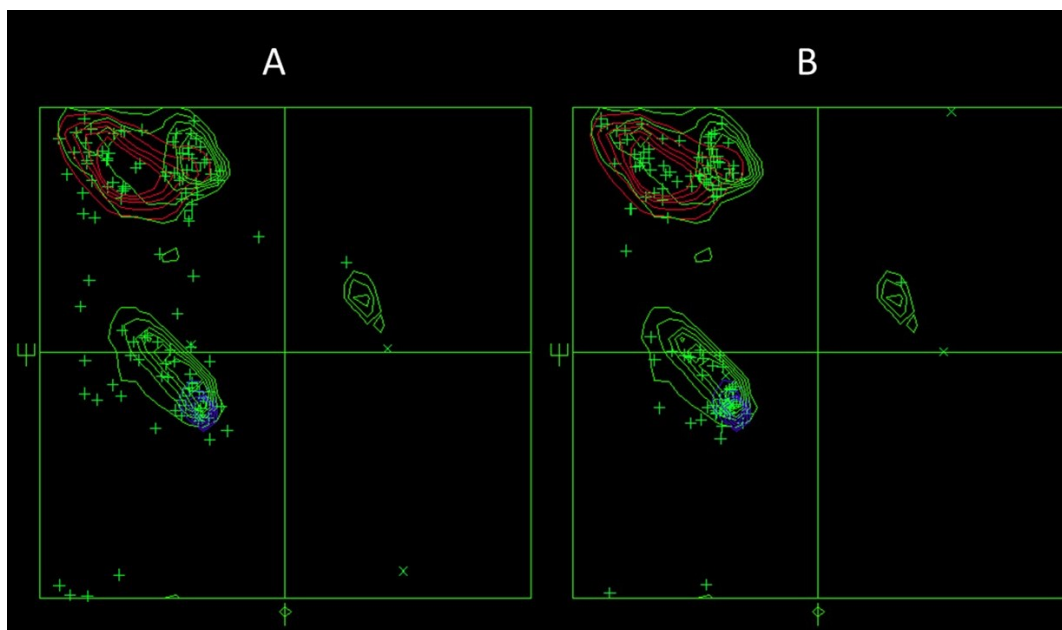
براساس مطالعه انجام گرفته برای سنجش فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 22 ± 558 U/mol تخمین زده شد. همان‌طور که روتوسکی در سال ۲۰۰۸ نشان داده است، سمیت سلولی رابطه مستقیمی با میزان فعالیت آنزیمی این آنزیم‌ها دارد (۳۰). در این مطالعه، از RNase A گاو به عنوان شاهد استفاده شد که میزان فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده مشابه اطلاعات ارائه شده فروهر مهر و همکاران (۲۰۲۰) بود (۱۰). همچنین، در این تحقیق آنزیم تولیدشده به وسیله پپسین انکوبه شد تا میزان مقاومت آن در مقابل پروتئازها اندازه‌گیری شود. آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در پپسین به میزان ۹۰٪ دست‌نخورده باقی ماند.

اثر سیتوتوکسییتی RNase گوسفند بر روی رده

جدول ۱- مقایسه خصوصیات فیزیوشیمیایی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند و گاو

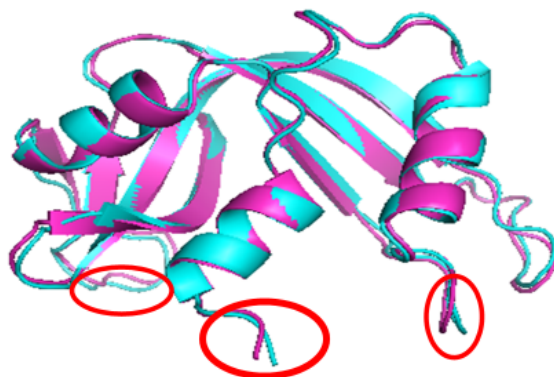
Table 1- Comparison of physicochemical properties of Ovine and Bovine pancreatic RNase A

ریبونوکلئاز پانکراس Pancreatic ribonuclease	Bovine گاو	Ovine گوسفند
تعداد اسیدآمینه Number of amino acids	124	124
وزن مولکولی Molecular weight	13690.29	13707.23
نقطه ایزو الکتریک pI Theoretical pI: 8.64	8.64	8.15
مقدار بار مثبت Total number of positively charged residues	10	11
مقدار بار منفی Total number of negatively charged residues	14	13
فرمول اتمی آنزیم Formula	C575H909N171O193S12 C574H904N170O196S12	
تعداد اتم‌ها Total number of atoms	1860	1856
نیمه‌عمر در گولبولهای قرمز نابلق پستانداران half-life (mammalian reticulocytes, in vitro)	1.3 hr.	1.3 hr.
نیمه‌عمر پروتئین در سلول‌های مخمر (yeast, in vivo)	3 min.	3 min.
نیمه‌عمر پروتئین در <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> , in vivo)	3 min.	3 min.
شاخص پایداری The instability index	42.12	44.26
شاخص آلدوستی Aliphatic index	46.45	45.65
متوسط هیدروپاتی Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.663	-0.681



شکل ۱- پلات رامچاندرا. A- پلات رامچاندرا قبل از انجام اصلاحات B- پلات رامچاندرا بعد از انجام شدن تصحیحات

Figure 1- The Ramachandran plot (A) The Ramachandran plot of initial model (B) The Ramachandran plot of refined model



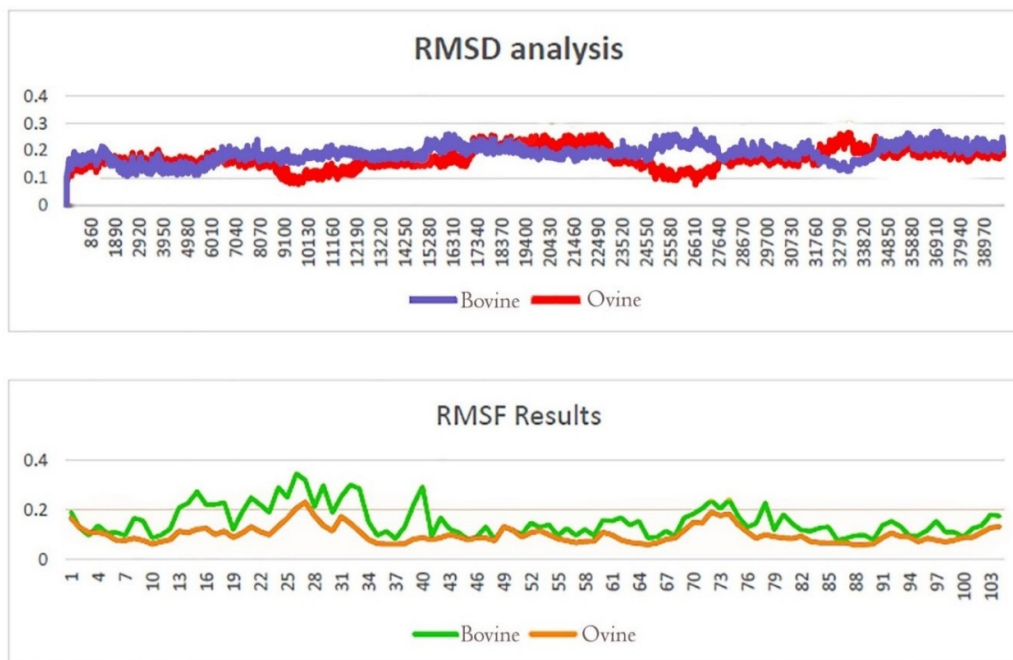
شکل ۲- هم‌ردیفی ریبونوکلئاز پانکراس گاو با ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

Figure 2- Alignment of the bovine RNase A with the ovine RNase A



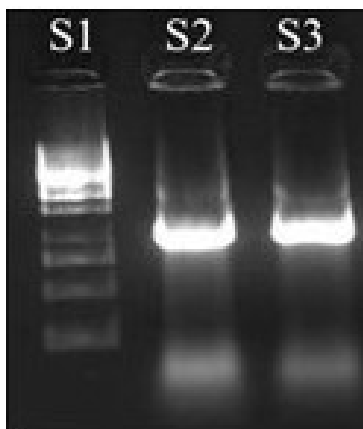
شکل ۳- ساختار سه‌بعدی RNase A گوسفند

Figure 3- 3D structure of the ovine RNase A

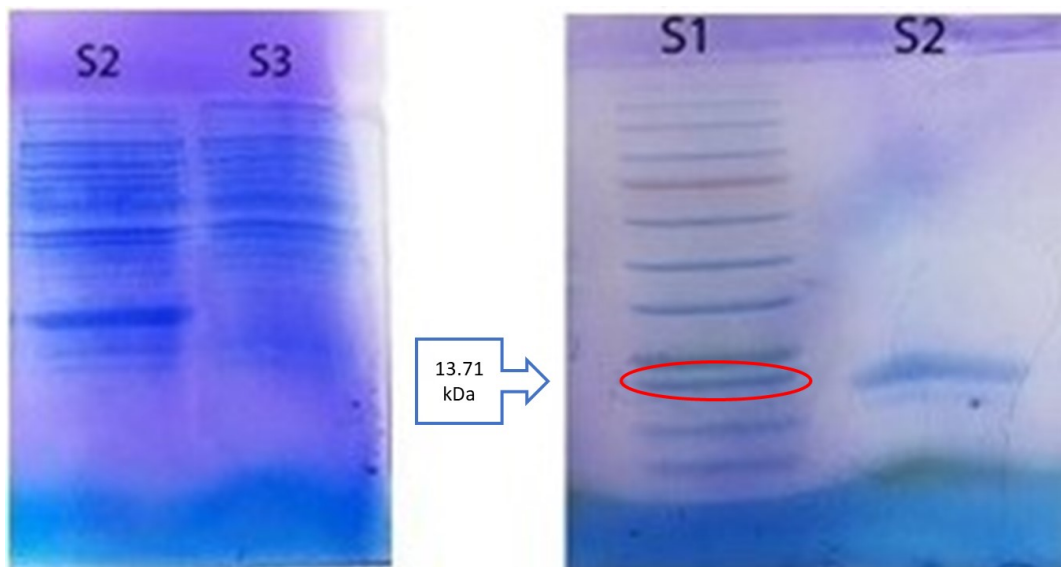


شکل ۴- RMSD و RMSF شبیه‌سازی آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی گاو و گوسفند نشان‌دهنده ثبات و تعادل ساختار این دو آنزیم است.

Figure 4- RMSD and RMSF analysis confirmed the stability of the ovine RNase.

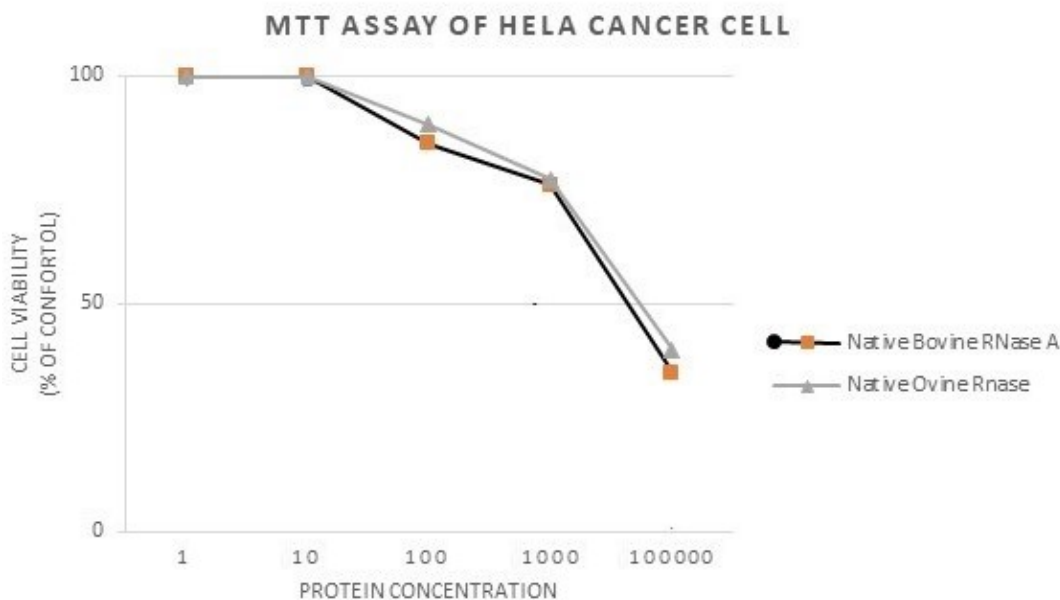


شکل ۵- نتیجه حاصل از کلونی PCR ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. S1: مارکر M100+ (شرکت ترمو، آمریکا)، S2 و S3: RNaseA طبیعی
Figure 5- The colony PCR of ovine RNase A, S1: M 100+ marker (Thermo, USA), S2 and S3: Native ovine RNase A.



شکل ۶- چپ: تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، S2: پروتئین طبیعی پانکراس گوسفندی، S3: *E. coli* BL21(DE3) with pET 21b (+). راست: نتایج نتایج خالص سازی پروتئین. S1: لدر پروتئین (Thermo, USA). S2: نتیجه خالص سازی پروتئین طبیعی گوسفند

Figure 6- Left: Recombinant protein production in *E. coli* BL21(DE3), S2: native ovine RNase A protein, S3: *E. coli* BL21(DE3) with pET 21b (+). Right: purification of the ovine RNase A. S1: protein ladder (Thermo, USA), S2: native ovine RNase A protein.



شکل ۷- نتایج MTT assay آنزیم RNase طبیعی گاو و گوسفند بر روی رده سلول‌های سرطانی HeLa. Figure 7- MTT assay of native and mutant ovine and bovine RNase A on HeLa cancer cell line.

ما نیز در بررسی‌های MDS با اندازه‌گیری RMSF، RMSD و Gyration curves میزان پایداری آنزیم تولید شده را بررسی کردیم. اطلاعات به دست آمده طی این تحقیق با داده‌های حاصل از مطالعات سال‌های قبل کاملاً همپوشانی و همخوانی داشت (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که بررسی‌های استاتیکی و دینامیکی راهکار مناسبی برای بررسی پایداری پروتئین‌ها پیش‌روی ما می‌نهند.

مطالعات و بررسی‌ها نشان داده‌اند که از آنزیم مهندسی‌شده RNase A گاو و گوسفند می‌توان به‌عنوان توکسین در ایمونوتوکسین‌ها به‌صورت فعال بهره گرفت. همان‌طور که بیان شد، RNase A طبیعی قابلیت سمیت در سطح سلول را ندارد که این، خود، یک مشخصه مثبت برای این آنزیم‌هاست، زیرا بدین ترتیب می‌تواند با اتصال به آنتی‌بادی به‌صورت انتخابی وارد سلول مدنظر شود و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی القا کند (۱۴). البته ما در این تحقیق به‌منظور بررسی سمیت RNase A طبیعی و القای مرگ از طریق آن با استفاده از لیپوفکتامین برای ورود آنزیم به سلول سمیت این آنزیم طبیعی را بررسی کردیم.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه نشان داد که آنزیم RNase A گاو و گوسفند شباهت فراوانی به یکدیگر دارند و RNase A گوسفندی قابلیت زیادی برای تولید تجاری و القای مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی دارد. همچنین، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، مانند آنزیم RNase A گاو، در خارج از سلول گیرنده سطح سلولی ندارد و وارد سلول نمی‌شود، زیرا RI آن را کاملاً مهار می‌کند. این یعنی، در صورت مهندسی‌کردن این آنزیم و تولید یک آنزیم جهش‌یافته با حفظ فعالیت آنزیمی که توانایی فرار از RI را داشته باشد، می‌توان از آن به‌عنوان یک بدیل مناسب به‌مناوبه توکسین در ایمونوتوکسین‌ها استفاده کرد. آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی جانشین مناسبی برای استفاده به‌عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌هاست، زیرا فعالیت و توکسیتی مشابه آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد با گزینش شماره ۳/۴۴۴۷۴ انجام یافته است.

۳۳). در این پژوهش، با تأیید پایداری آنزیم به‌واسطه اطلاعات دینامیکی از فعال بودن آنزیم نیز اطمینان حاصل شد. مقاومت آنزیم در مقابل پیپسین هم نشان از ساختار صحیح آنزیم تولیدی داشت، زیرا در سال ۱۹۸۴ اسمیت و همکاران نشان داده‌اند که آنزیم فقط با داشتن ساختار صحیح قابلیت مقاومت در حضور پیپسین را خواهد داشت (۲۸). ما در مطالعات MDS آنزیم مدنظر را مدل قرار دادیم، چه‌اینکه در بررسی‌های پیشین RNase A گاوی مدل کریستالوگرافی آن مدنظر قرار گرفته است (۱۰، ۱۸ و ۲۳).

از آنجاکه آنزیم مدنظر ما شباهت بسیار زیادی به آنزیم گاوی دارد و تنها در ۴ اسید آمینه با آن متفاوت است، انتظار می‌رود که یک آنزیم مناسب با قابلیت بالا برای استفاده به‌عنوان توکسین باشد. ما در مطالعات MDS پس از بررسی RNase A گاو در شکل کریستالوگرافی ثبت‌شده RNase A گوسفند را جانشین ساختیم. این شبیه‌سازی آنزیم RNase A طبیعی گوسفند و گاو نشان از شباهت زیاد بین این دو آنزیم و میزان تعادل بالای آن‌ها در فشار ۱ اتمسفر و دمای بدن داشت که از طریق مسیرهای آزمایشگاهی نیز تأیید شد (۱۰ و ۱۸). مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام گرفته است نشان داده‌اند که بسیاری از ریبونوکلئازها، مانند انکوناز، ریبونوکلئاز سمینال گاو و نیز ریبونوکلئاز پانکراس گاو، وقتی به‌عنوان یک ایمونوتوکسین از آن‌ها استفاده شده است، بعد از ورود به سلول‌های سرطانی مانع از تولید پروتئین در آن‌ها شده‌اند (۱، ۷، ۹، ۱۶، ۱۹، ۲۷ و ۳۰).

ساندلس و همکاران (۲۰۱۱) ۱۳ نوع پروتئین از نوع آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس قورباغه راناپیراناز تولید کردند و با این پروتئین‌ها اثرات پیوندهای بین RNase A و RI را آشکار ساختند. با توجه به این تحقیقات، به‌نظر می‌رسد می‌توان از RNase A گوسفند یک آنزیم جهش‌یافته تولید کرد که توانایی فرار از RI را داشته باشد، زیرا همان‌طور که بررسی‌ها نشان داده‌اند RNase A گاو و گوسفند در حضور RI کاملاً غیرفعال می‌شوند (۲۹). طی یک دوره مطالعات در سال ۲۰۲۰، فروهر مهر و همکاران از RNase A گاو یک نوع آنزیم جهش‌یافته تولید کردند که قابلیت فرار از RI را داشت (۱۰).

منابع

1. Ardelt, W., K. Shogen, and Z. Darzynkiewicz. 2008. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):215-225.
2. Barnard, E. 1969. Biological Function of Pancreatic Ribonuclease. *Nature*, 221: 340-344.
3. Becker, R. R., J. L. Halbrook, and C. Hirs.. 1973. Isolation and Characterization of Ovine Ribonuclease A, B, and C from Pancreatic Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 248:7826-7832.
4. Breukelman, H. J., N. Munnik, and R. Kleinedam. 1998. Secretory ribonuclease genes and pseudogenes in true ruminants. *Gene*, 212(2):259-68.
5. Beintema, J. J., and J. M. van der Laan. 1986. Comparison of the structure of turtle pancreatic ribonuclease with those of mammalian ribonuclease. *The Federation of European Biochemical Societies*, 194(2):338-343.
6. Claudi, M., M. Cuchillo, R. Victòria Nogués, and T. Raines. 2011. Bovine Pancreatic Ribonuclease: 50 Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. *The Journal of Biochemistry*, 50(37):7835-7841.
7. De Lorenzo, C., A. Nigro, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2002. A new RNase-based immunoconjugate selectively

- cytotoxic for ErbB2-overexpressing cells. *The Federation of European Biochemical Societies*, 516(1-3):208-212.
8. De Lorenzo, C., A. Arciello, R. Cozzolino, D. B. Palmer, P. Laccetti, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2004. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Research*, 64(14):4870-4874.
 9. DelCardayr, S. B., M. Ribio, E. M. Yokel, D. J. Quirk, W. J. Rutter and R. T. Ruines. 1995. Engineering ribonuclease A: Production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Engineering*, 18:261-273.
 10. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh. 2020. Production and introduction of a novel immunotoxin based on mutant RNase A for inducing death to Her1□positive cell lines. *Journal of Cell Physiology*, doi: 10.1002/jcp.29346
 11. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh, A. 2018. Different Signal Peptides for Secretory Production of Recombinant Bovine Pancreatic Ribonuclease A in Gram Negative Bacterial System: An In silico Study. *Current Proteomics*, 15: 24-31
 12. Gesteland. R. F., and J. Atkins. 1993. *The RNA World*. Cold SpringHarbor LaboratoryPress Plainview, NY.
 13. Ghovvati, S. 2014. Engineering ScFv-FC antibody bound to RNase to target HER2 antigen. Doctoral dissertation, Ferdowsi University. (In Persian)
 14. He, F. 2011. Bradford Protein Assay. *Biotechnology Innovation Organization*, 101:e45. 10.21769.45.
 15. Jaydarian, A., N. Nazifi, and A. Forouharmehr. 2020. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against *Coxiella burnetii*. *Human Immunology*, 10:10-16.
 16. Leich, F., N. Stohr, A. Rietz, R. Ulbrich-Hofmann, and U. Arnold. 2007. Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38):27640-27646.
 17. Lomax, J. E., C. M. Bianchetti, A. Chang, G. N. Phillips, B. G. Fox, and R. T. Raines. 2014. Functional evolution of ribonuclease inhibitor: insights from birds and reptiles. *Journal of Molecular Biology*, 426(17):3041- 3056.
 18. Lu, L., J. Li, M. Moussaoui, and E. Boix. 2018. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*, 9:1012.
 19. Menzel, C., T. Schirrmann, Z. Konthur, T. Jostock, and S. Dubel. 2008. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood*, 111(7):3830-3837.
 20. Merlino, A., L. Mazzarella, A. Carannante, A. Di Fiore, A. Di Donato, E. Notomista, and F. Sica. 2005. The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of onconase mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 6;280(18):17953-60.
 21. Pikkemaat, M. G., B. M. Linssen, J. C. Berendsen, and D. B. Janssen. 2002. Molecular dynamics 355 simulations as a tool for improving protein stability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 15:185-192.
 22. Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chemical Review*, 98:1045-1065.
 23. Riccio, G., C. D. Avino, R. T. Raines, C. D. Lorenzo. 2013. A novel fully human antitumor ImmunoRNase resistant to the RNase inhibitor. *Protein Engineering, Design & Selection*, 26:243-248.
 24. Rutkoski, T. J., and R. T. Raines. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of 360 ribonuclease cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):185-9.
 25. Sells, M., J. Li, and J. Chernoff. 1995. Delivery of proteins into cells using cationic liposomes. *BioTechniques*, 19(1):72-6.
 26. Stigh, E., G. Aqvist, and C. B. Anfinsen. 1958. The Isolation and Characterization of Ribonucleases from Sheep Pancreas. *The Journal of Biological Chemistry*, 234:1112-1117.
 27. Schirrmann, T., J. Krauss, M. A. Arndt, S. M. Rybak, and S. Dubel. 2009. Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(1):79-95.
 28. Schmid, F., and H. Blaschek. 1984. An early intermediate in the folding of ribonuclease A is protected against cleavage by pepsin. *Biochemistry*, 23(10):2128- 2133.
 29. Sundlass, N. K., and R. T. Raines. 2011. Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of onconase. *Biochemistry*, 50(47):10293-9.
 30. Turcotte, R. F., L. D. Lavis, and R. T. Raines. 2009. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *The Federation of European Biochemical Societies*, 276(14):3846-3857.
 31. Tripathy, D. R., A. K. Dinda, A. K., and Dasgupta, S. 2013. A simple assay for the ribonuclease activity of ribonucleases in the presence of ethidium bromide. *Analytical Biochemistry*, 437(2):126-9.
 32. <http://www.uniprot.org>
 33. Welling, G., Scheffer, A., and Beintema, J. 1974. The Primary structure of goat and sheep pancreatic ribonucleases. North-Holland Publishing Company – Amsterdam,41:58- 61.
 34. Zeiske, T., Stafford, K. A., and Palmer, A. G. 2016. Thermostability of Enzymes from Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14;12(6):2489-92



Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics

Mahsa Zabetian¹, Mohammadreza Nassiri², Ali Javadmanesh³, Shahrokh ghovati⁴

Submitted: 25-10-2020

Accepted: 26-12-2020

Zabetian, M., M. R. Nassiri, A. Javadmanesh, and S. Ghovati. 2021. Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):429-440.

Introduction Obviously, the recent decades strategy in cancer therapy, anticancer drug discovery and drug improvement is to characterize, distinguish and validate the most promising cancer-related molecular targets to which new drugs can be designed. The unique features of the pancreatic RNase (RNase A) such as high activity, stability, lack of a cofactor, and small molecular size have made it the most popular enzyme in the ribonuclease family. Specifically, RNase A is involved in endonucleolytic cleavage of 3'-phosphomononucleotides and 3'-phosphooligonucleotides ending in C-P or U-P with 2', 3'-cyclic phosphate intermediates. RNase A was purified from the Bovidae family including bovine, ovine, bison, eland, goat and gnu. Although phylogenetic analyses of RNase A revealed high similarity among members of the Bovidae family, some functional mutations were also found. Several studies showed that the RNA hydrolyzing action of ribonuclease is able to induce apoptosis and cell death in cancer cells, independently. This effect could be enhanced thousands of times when ribonuclease is linked to antibodies. These enzymes show potent cytotoxic activity on cell internalization but do not show sensible immunogenicity or non-specific toxicity toward normal cells. Ovine pancreatic ribonuclease enzyme is a member of super family RNase A, it can be a good candidate as a toxin for designing new drugs. The objective of this study was to produce ovine pancreatic ribonuclease enzyme in *E. coli* and characterize its activity.

Materials and methods All structures needed for this study were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) website (<http://www.rcsb.org/>). PDB files (accession numbers: 10.2210 /pdb1YV6/pdb and 10.2210/pdb3SNF/pdb) related to natural Bovine Pancreatic RNase were selected. Gene synthesis and production of recombinant protein were conducted by using the pelB signal sequence at the beginning of the structure for periplasmic protein production. The native ovine RNase and bovine RNase A were optimized for *E. coli* host by GenRay codon optimization service and sent to GenRay Biotechnology (Shanghai, China) for synthesis. The target genes in pGH vector were sub-cloned in pUC19 and then cloned into the pET21b (+) vector between XbaI and HindIII sites. After transformation, *E. coli* cells containing recombinant pET21b (+) were cultivated in LB broth medium containing ampicillin. To extract the proteins, osmotic shock methods were applied. After that Q-sepharose chromatography was used to extract the target protein. Finally, Bradford analysis was used to determine the protein concentration. The ribonucleolytic activity of the recombinant native ovine RNase A was compared with native bovine RNase A following Tripathy et al (2013) method. To investigate the antitumor activity of recombinant proteins, HeLa cells were prepared for seeding in a 96-well flask and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 72 h.

Results and discussion The production of native ovine and bovine RNase A was confirmed by SDS PAGE. Protein purification was successfully performed using osmotic shock in the Q-Sepharose column. Although our findings confirmed protein expression, no detectable proteins other than RNase A was observed in the LB medium, indicating that almost all the proteins were expressed either inside the bacterial cell or secreted into the periplasmic

- 1- Ph.D student, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
 - 2- Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
 - 3- Assistant Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
 - 4- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, University of Guilan, Iran.
- (*Corresponding author email: nassiry@um.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.2020.38319.0

area. According to the Bradford analysis, the concentration of the recombinant proteins extracted was 4.78 ovine RNase A. Based on our results, it was shown that the ribonucleolytic activity of native ovine RNase A was 558 ± 22 . The results showed that RNase A exhibited resistance to pepsin degradation during the whole incubation process (22 h), in the course of which 90% of RNase A remained undamaged. To determine the cytotoxic effect of ovine RNase on the HeLa cell line, MTT assay was done following incubation with ovine RNase A. The commercial RNase A was used as control. The results showed that ovine RNase A and bovine RNase A had no cytotoxic effect on HeLa cells. When RNase treatment was done by the lipofectamine 3000 (Thermo, USA), the cytotoxicity effect was observed. Several studies have shown that some ribonucleases such as onconase, bovine seminal ribonuclease and bovine pancreatic ribonuclease have a great promise as cancer immunotherapeutic agents and cause a significant reduction in the protein synthesis of tumor cells after internalization into cytosol.

Conclusion Our findings demonstrate that ovine RNase similar to bovine RNase has a great potential for use in drug design industry. We revealed that the native ovine RNase A was more stable than the native bovine RNase. In future work, we intend to fuse the engineered ovine-RNase A to dedicated recombinant antibodies for cancer therapy and investigation of engineered immuno-ribonuclease potency and cell killing effects as a fusion protein.

Keywords: Bioinformatics, Biological activity, Cytotoxicity, Ovine pancreatic ribonuclease.