



Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Urate Oxidase Using Intein Sequence and Elastin-like Protein

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Azizi M.* PhD,
Enayati S.¹ MSc,
Salmasizadeh M.¹ BSc,
Zarreia N.¹ PhD,
Khalaj V.¹ PhD

How to cite this article

Azizi M, Enayati S, Salmasizadeh M, Zarreia N, Khalaj V. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Urate Oxidase Using Intein Sequence and Elastin-like Protein. Pathobiology Research. 2018;21(1):7-13.

*Medical Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

¹Medical Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Department of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Square, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551
Phone: +98 (21) 64112442
Fax: +98 (21) 66480780
m.azizi@pasteur.ac.ir

Article History

Received: October 29, 2017
Accepted: December 17, 2017
ePublished: April 10, 2018

ABSTRACT

Aims Expression and purification of recombinant Urate oxidase as well as other pharmaceutical proteins are a costly process. The use of non-chromatographic methods in the purification process can reduce production costs. So, the aim of this study was cloning, expression, and purification of recombinant urate oxidase, using intein sequence and elastin-like protein (ELP).

Materials & Methods In the present experimental research, the synthetic urate oxidase gene was cloned in downstream of ELP-Intein in an expression plasmid. After cultivating bacteria containing urate oxidase expression plasmid, the soluble fraction of cell lysate was separated from insoluble portion, using centrifugation. The recombinant urate oxidase was precipitated by adding salt and incubation at 37°C. The resulting precipitant was resuspended in cleavage buffer and the urate oxidase was separated from ELP through Intein moiety. Adding salt for the second time and incubation at 37°C resulted in separation of urate oxidase from fusion partner. After expressing and purifying the urate oxidase, purity and biological activity of recombinant urate oxidase were compared to standard drug.

Findings The recombinant urate oxidase was expressed and purified using ELP and Intein tags as fusions partners. The recombinant enzyme showed a purity of %90 equal to 1.89 mg.ml⁻¹ based on protein concentration and 1.64 mg.ml⁻¹ based on activity.

Conclusion Using Intein sequence and Elastin-like protein, together with the Urate Oxidase enzyme helps to express and purify the enzyme without need for a chromatographic method.

Keywords Urate Oxidase; Purification; Intein; Elastin

CITATION LINKS

- [1] A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis [2] Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: Results of a compassionate-use trial [3] Letter: Urate-oxidase treatment for hyperuricaemia. Lancet [4] High-level production of a peroxisomal enzyme: *Aspergillus flavus* uricase accumulates intracellularly and is active in *Saccharomyces cerevisiae* [5] Urate oxidase purification by salting-in crystallization: Towards an alternative to chromatography [6] Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene [7] High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli* [8] Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli* [9] Treating gout with pegloticase, a PEGylated urate oxidase, provides insight into the importance of uric acid as an antioxidant in vivo [10] Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of the GRAAL1 (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Trial on Rasburicase Activity in Adult Lymphoma) study [11] An improved nonchromatographic method for the purification of recombinant proteins using elastin-like polypeptide-tagged proteases [12] Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags [13] Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris* [14] Molecular cloning: A laboratory manual [15] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [16] Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association [17] Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution [18] Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation [19] Purification of microbially expressed recombinant proteins via a dual ELP split intein system [20] Affinity purification of proteins in tag-free form: Split intein-mediated ultrarapid purification (SIRP) [21] Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme

همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین

محمد عزیزی* PhD

بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

سمیه عنایتی MSC

بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مریم سلماسی‌زاده BSc

بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نجمه زارعی PhD

بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

وحید خلج PhD

بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب همانند سایر پروتئین‌های دارویی مستلزم صرف هزینه‌های زیادی است. استفاده از روش‌های غیرکروماتوگرافی در فرآیند خالص‌سازی می‌تواند سبب کاهش هزینه‌های تولید شود. بنابراین، هدف پژوهش حاضر، همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، ژن صناعی اورات‌اکسیداز در پایین‌دست توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین در پلاسمید بیانی قرار داده شد. بعد از کشت باکتری حاوی پلاسمید بیان‌کننده اورات‌اکسیداز، سلول‌ها لیز و محتوی پروتئین محلول از غیرمحلول به‌وسیله سانتریفوژ جدا شد. با افزودن نمک به بخش محلول حاوی اورات‌اکسیداز و در دمای ۳۷°C، آنزیم مورد نظر رسوب داده شد. با انحلال رسوب در بافر خاص برش و به‌واسطه حضور توالی اینتئین، اورات‌اکسیداز تولیدشده از پروتئین شبه‌الاستین جدا شد. با افزودن مجدد نمک در دمای ۳۷°C پروتئین شبه‌الاستین رسوب و اورات‌اکسیداز در محلول باقی ماند. پس از بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز، میزان خلوص و فعالیت زیستی آن مورد ارزیابی قرار گرفت و با داروی استاندارد مقایسه شد.

یافته‌ها: آنزیم اورات‌اکسیداز نوترکیب به‌صورت فیوژن با توالی کدکننده اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بیان و خالص شد. میزان خلوص ۹۰٪ در این روش حاصل شد که معادل ۱/۸۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین بود. میزان مذکور معادل ۱/۶۴ میلی‌گرم براساس فعالیت آنزیمی بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین به‌صورت همراه با آنزیم اورات‌اکسیداز به بیان و خالص‌سازی این آنزیم بدون نیاز به روش کروماتوگرافی کمک می‌کند.

کلیدواژه‌ها: اورات‌اکسیداز، خالص‌سازی، اینتئین، الاستین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶

* نویسنده مسئول: m.azizi@pasteur.ac.ir

مقدمه

آنزیم اورات‌اکسیداز در بسیاری از موجودات و پستانداران به‌صورت طبیعی تولید می‌شود و تبدیل اسیداوریک به آلانتوئین را کاتالیز می‌نماید. شکل دارویی این آنزیم، راسبوریکاز است که به شکل نوترکیب تولید شده است. داروی راسبوریکاز یا اورات‌اکسیداز نوترکیب با نام تجاری الیتک (Elitek)، یک عامل موثر در کاهش غلظت سرمی اسیداوریک در بیماران مبتلا به افزایش اسیداوریک خون است. این داروی نوترکیب در کودکان مبتلا به لوسمی که در پاسخ به عوامل شیمی‌درمانی دچار غلظت‌های بالای اسیداوریک می‌شوند بر دیگر داروی کاهنده اسیداوریک، یعنی آلوپورینول ارجحیت دارد [1, 2].

این آنزیم اولین بار از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) جدا شد و در ایتالیا و فرانسه با نام تجاری یوریکوزایم

به‌منظور کاهش موقتی و سریع اسیداوریک خون در بیماران مبتلا به هیپراوریسمی به کار گرفته شد. این دارو مشکلات کمتری از لحاظ ایمنی‌زایی و حلالیت در مقایسه با انواع باکتریایی داشت [3]. در تحقیقات بعدی ژن اورات‌اکسیداز از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) همسانه‌سازی شد و بیان آن تولید پروتئینی با حلالیت مناسب‌تر و ایمنی‌زایی کمتری نسبت به سایر روش‌های تولیدی نشان داد [4]. فرم دارویی راسبوریکاز نوترکیب در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تولید می‌شود و در واقع روش اصلی تولید این دارو مبتنی بر بیان در مخمر است [5]. از انواع سیستم باکتریایی مانند *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*) و مخمری مانند *هانسنولا پلی‌مورفا* (*Hansenula polymorpha*) برای بیان این پروتئین استفاده شده است [6-8]. برای افزایش کارایی این آنزیم در بدن، فرم‌های متفاوتی از قبیل پگیله‌شده و شکل کوچک‌شده تهیه و بیان آنها در میزبان‌های مختلف بررسی شده است [9].

اگرچه ژن مربوط به تولید این آنزیم در انسان وجود دارد، اما ظاهراً به‌دلیل یک جهش نامفهوم در ناحیه رمزکننده، تولید آن در انسان صورت نمی‌پذیرد. گمان می‌رود این واقعه تکاملی به‌دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی اسیداوریک رخ داده باشد [10]. اورات‌اکسیداز یک آنزیم هوموترامر با وزن ۱۳۵ کیلودالتون است که دارای ۴ جایگاه فعال در حد فاصل ۴ زیرواحد یکسان خویش است (هر جایگاه فعال ۳۴ کیلودالتون) [10]. اورات‌اکسیداز قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* از لحاظ عدم نیاز به هیچ گونه کوفاکتور ارگانیک یا اتم فلزی برای فعالیت خود، منحصربه‌فرد است. در ساختار این آنزیم ۲۴ آمینواسید حفظ‌شده وجود دارد که ۱۵ عدد از آنها در جایگاه فعال حضور دارند. این آنزیم علاوه بر کاربردهای درمانی در کیت‌های تشخیصی تعیین اسیداوریک سرم نیز به کار می‌رود.

توالی پروتئین شبه‌الاستین در سال‌های اخیر برای خالص‌سازی پروتئین‌های همراه مورد توجه قرار گرفته است. این پپتید متشکل از ۶۰ تا ۱۱۰ تکرار توالی VPGXG است که در آن X هر اسید آمینه‌ای می‌تواند باشد. این توالی می‌تواند به‌صورت برگشت‌پذیر رسوب کند و با تغییر شرایط بافری به‌تناوب به شکل رسوب و محلول ظاهر شود [11]. توالی دیگری که در چند سال اخیر مورد استفاده قرار گرفته، توالی اینتئین است که دارای قابلیت برش خودبه‌خودی در دمای محیط و pH نزدیک به خنثی است [12].

در مطالعات قبلی توالی ژن کدکننده این آنزیم با طول ۹۶۳ جفت باز از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* گرفته و به‌صورت مصنوعی ساخته شده است. پس از همسانه‌سازی این ژن در مخمر *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*)، پروتئین مذکور با موفقیت در این میزبان بیان شده است [13]. با پیشرفت‌های اخیری که در طراحی ناقل‌های بیانی و سویه‌های جدید پروکاریوتی اتفاق افتاده است، قابلیت پردازش و شکل‌گیری صحیح پروتئین هدف مشابه با آنچه که در سیستم‌های یوکاریوتی وجود دارد، امکان‌پذیر شده است. لذا به‌دلیل سهولت تولید پروتئین در میزبان پروکاریوتی (بیان بالا، افزایش حجم تولید ساده، محیط کشت ارزان و مقرون‌به‌صرفه بودن فرآیند) باکتری *اشریشیاکلی* مورد توجه قرار گرفت.

در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی امکان بیان اورات‌اکسیداز در باکتری *اشریشیاکلی* و قابلیت پردازش و تاخوردگی مناسب در سیستم پروکاریوتی، ژن مورد نظر در پایین‌دست توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین قرار گرفت و بیان آن در سیستم بیانی *اشریشیاکلی* با روش‌های مرسوم القا شد. در نهایت، پروتئین

الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید مورد بررسی قرار گرفت. سپس سلولی که مقدار تولید بالاتری را در الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید و وسترن‌بلات نشان داد، انتخاب شد.

کشت باکتری و بیان پروتئین: برای بیان و تخلیص آنزیم اورات اکسیداز، سلول‌ها در حجم یک‌لیتر کشت و در شرایط القا قرار گرفتند. ابتدا یک تک‌کلونی در ظرف حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط

کشت و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در دمای ۳۷°C کشت داده شد. بعد از ۱۶ ساعت، این کشت ۲۵ میلی‌لیتری به ظرف جدید حاوی یک‌لیتر محیط کشت تازه منتقل شد و برای مدت ۶ ساعت در همان دما قرار گرفت. پس از رسیدن تراکم سلول به $OD_{600} \sim 0.6$ ، مقدار یک‌میلی‌لیتر از محلول ایزوپروپیل β-D-1-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت یک‌مولار افزوده شد تا غلظت نهایی به یک‌میلی‌مولار برسد و به‌صورت شبانه در شرایط القا کشت داده شد.

تخلیص پروتئین: توده زیستی باکتریایی حاصل از یک‌لیتر محیط کشت با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و برای مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد. سلول‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر بافر مخصوص لیز سلولی (Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، pH برابر با ۸/۵، EDTA ۲ میلی‌مولار، لیزوزیم ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) سوسپانسیون شد. سوسپانسیون حاصل برای مدت ۴۵ دقیقه روی یخ نگهداری شد و پس از این زمان از دستگاه هموژنایزر فشاریلا برای لیز سلولی استفاده شد. پس از ۲-۳ مرحله عبوردادن از دستگاه هموژنایزر از لیز سلولی اطمینان حاصل شد. بخش محلول از باقی‌مانده نامحلول لیز سلولی به‌وسیله سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه جدا شد.

به مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از بخش محلول حاصل از لیز سلولی، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمک سدیم‌کلراید ۳ مولار افزوده شد و از طریق ورتکس نمونه‌ها مخلوط شد. محلول حاصل در شرایط دمای ۳۰°C برای مدت ۱۵ دقیقه همراه با هم‌زدن آرام در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. بعد از این مدت تیوب‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل از محلول بالایی جدا شد. در این مرحله، رسوب نگهداری و محلول بالایی بعد از برداشت نمونه برای آنالیز دور ریخته شد. رسوب به‌دست‌آمده در یک میلی‌لیتر از بافر فسفات‌سالین (PBS) به‌علاوه ۴۰ میلی‌مول تریس (بیس-تریس، pH برابر با ۶/۲) و ۲ میلی‌مول EDTA حل شد.

نمونه در طول شب در دمای ۲۲-۱۸°C نگهداری شد. بعد از کامل‌شدن فرآیند برش، یک میلی‌لیتر از نمک سدیم‌کلراید ۳ مولار افزوده شد و پس از مخلوط‌شدن به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰°C قرار گرفت. بعد از این مدت نمونه برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در سرعت دوران ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سوپ بالایی که حاوی پروتئین خالص‌شده بود، به تیوب جدید منتقل شد. برای ارزیابی خلوص پروتئین‌ها در هر مرحله از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید استفاده شد. در مواردی که نیاز به خلوص بیشتری بود این فرآیند برای یک مرتبه دیگر از ابتدا اجرا شد.

ارزیابی فرآیند تخلیص به‌وسیله الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید و وسترن‌بلات: برای بررسی فرآیندهای مختلف بیان و نیز خلوص پروتئین به‌دست‌آمده، نمونه‌های پروتئینی روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰% تحت شرایط احیاکنندگی (با اضافه‌کردن مرکاپتوانانول) الکتروفورز شدند. برای رنگ‌آمیزی باندهای پروتئین از رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو و در مواردی که نیاز به حساسیت بیشتری بود، از

نوترکیب حاصل به‌واسطه حضور توالی‌های فوق، تخلیص و فعالیت زیستی آن مورد سنجش قرار گرفت. بنابراین هدف پژوهش حاضر همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود.

مواد و روش‌ها

ساخت ناقل بیانی: در پژوهش تجربی حاضر، قطعه ژن مربوط به اورات اکسیداز (شرکت Gene Ray؛ چین) در مطالعات قبلی این گروه، سنتز شده و موجود بود. در مرحله بعد این ژن به‌وسیله آغازگرهای زیر تکثیر شد:

آغازگر رفت: TGTACACAACCTCTGCCGTCAAAG

آغازگر برگشت: CCATGGTTAATGGTATGATGGTGGTG

طراحی آغازگرها به‌صورتی انجام شد که در ابتدای ژن جایگاه برش آنزیم *BsrG1* و در انتهای آن جایگاه برش آنزیم *NcoI* قرار گیرد. به این صورت امکان همسانه‌سازی در ناقل هدف که حاوی ژن‌های اینتئین و ژن پروتئین شبه‌الاستین بود فراهم شد. پس از تکثیر ژن با استفاده از این آغازگرها محصول PCR در ناقل T/A (*Promega, pGEM@-T Easy Vector*) همسانه‌سازی شد. برای انتقال پلاسمید، سلول‌های مستعد به‌روش کلسیم‌کلراید تهیه شد^[14]. در این مرحله از باکتری /شریشی‌کلی سویه *DH5α* به‌عنوان میزبان استفاده شد. با استفاده از روش استاندارد تراریختی یا شوک حرارتی، انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان صورت گرفت^[14]. برای انتخاب کلون‌های نوترکیب از کشت روی محیط جامد و جداکردن تک‌کلونی استفاده شد. بعد از اطمینان از قرارگرفتن محصول PCR در ناقل واسط، ژن اورات اکسیداز مجدداً با آنزیم‌های برش‌گر جدا و در ناقل بیانی همسانه‌سازی شد. برای این منظور و برای شکل‌گیری صحیح چهارچوب خواندن، تنها امکان استفاده از آنزیم *BsrG1* وجود داشت. از طرفی توالی ژن اورات اکسیداز صناعی (*Synthetic*) حاوی یک جایگاه *BsrG1* است که این ژن را به دو قطعه تبدیل می‌کند. برای جلوگیری از خردشدن کامل ژن، از طریق برش نسبی با آنزیم‌های *BsrG1/NcoI* ژن مربوطه از ناقل واسط جدا شد. در این نحوه برش با هضم آنزیمی و کنترل محصول برش در زمان‌های مختلف، قطعه کامل مورد نظر به دست آمد. قطعه مذکور با استفاده از کیت‌های خالص‌سازی تجاری از ژل استخراج و در جایگاه *BsrG1/NcoI* ناقل هدف *pET-ELP-I-CAT* همسانه‌سازی شد^[12]. این ناقل از سری ناقل‌های pET بود که سایر اجزا در آن از قبل همسانه‌سازی شده بود. پس از قرارگرفتن ژن در ناقل بیانی با هضم آنزیمی و انجام PCR روی ژن مورد نظر حضور آن بررسی شد. پس از تایید حضور ژن، پلاسمید در مقیاس انبوه استخراج شد.

تراریخت و غربالگری کلون‌های بیان‌کننده: از باکتری /شریشی‌کلی سویه BL21 DE3 برای بیان استفاده شد. سلول‌های مستعد برای انتقال پلاسمید به‌روش کلسیم‌کلراید تهیه شدند و از طریق شوک حرارتی انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان انجام شد^[14]. برای انتخاب کلون‌های نوترکیب کشت روی محیط جامد و جداسازی تک‌کلونی انجام شد. به‌منظور یافتن کلون‌هایی با بیان بیشتر چندین کلونی نوترکیب در پلیت کشت به‌صورت جداگانه رشد داده شدند. برای بررسی میزان بیان، هر یک از این کلونی‌ها در شرایط القا، کشت داده شدند و میزان بیان هر کلونی به‌صورت جدا توسط

به منظور استاندارد نمودن روش مورد استفاده و نیز به حداقل رساندن خطای آزمون و تاثیر فاکتورهای بیرونی، تمام شرایط برای نمونه کنترل مثبت و نمونه آزمون یکسان فراهم شد. روش مورد استفاده به قرار زیر بود.

مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه خالص شده نهایی با غلظت ۱/۸۶ میلی گرم بر میلی لیتر (بر اساس روش برادفورد) برای بررسی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت و در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. برای رسم منحنی استاندارد از داروی موجود در بازار به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. مقادیر متفاوت صفر، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میکرومول از آنزیم استاندارد نیز در چاهک های دیگر پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد. حجم نهایی تا حجم ۴۰ میکرولیتر با فسفات بافر تکمیل شد تا شرایط یکسان برای نمونه آزمون و استاندارد فراهم شود. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول واکنش که حاوی ۶ میلی مول اسیداوریک در بافر بورات بود، به تمام چاهک ها اضافه شد. ترکیب بافر بورات شامل بوریک اسید ۱۰۰ میلی مولار، سدیم کلراید ۷۵ میلی مولار، سدیم تترابورات ۲۰ میلی مولار و pH آن برابر ۸/۶ بود. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۱۵ واحد پراکسیداز در میلی لیتر در بافر فسفات افزوده شد. در ادامه مقدار ۱۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۳۰ میلی مول ۴-آمینوآنتی پیرین و ۱٪ فنل افزوده شد. واکنش در دمای ۳۷°C برای مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و سپس جذب چاهک ها در طول موج ۵۰۵ نانومتر خوانده شد. غلظت آنزیم استاندارد ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر معادل ۲/۷ واحد در میلی لیتر بود. با رسم منحنی استاندارد بر اساس جذب حاصل از غلظت های مختلف استاندارد، فعالیت آنزیمی پروتئین خالص شده با معادله خط مربوطه به شرح زیر محاسبه شد:

$$Y = 0.0085X + 0.0159$$

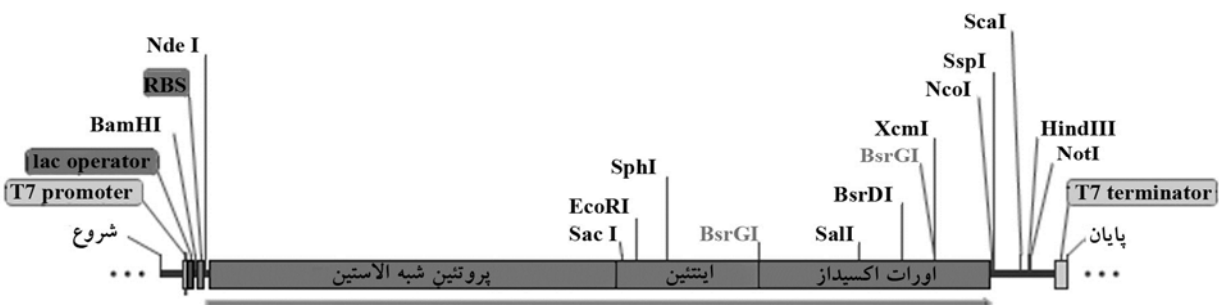
یافته ها

توالی کدکننده آنزیم اورات اکسیداز در پایین دست توالی کدکننده پروتئین شبه الاستین و توالی اینتئین در پلاسمیدی با پایه PET قرار گرفت (شکل ۱). بعد از انتقال پلاسمید نو ترکیب به باکتری *شریشیاکلی*، سویه BL21-DE3 کلونی های حاصل از نظر میزان بیان، ارزیابی و بر مبنای مقایسه میزان بیان در ژل پلی آکریلامید چندکلونی مجزا انتخاب و با شماره گذاری در فریزر ۷۰°C نگهداری شد. این سلول باکتریایی برای بیان پروتئین اورات اکسیداز و خالص سازی استفاده شد.

رنگ آمیزی نقره به روش استاندارد استفاده شد. در مرحله ای که نیاز به شناسایی و تایید پروتئین هدف بود، از آزمون وسترن بلات با به کارگیری آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی تولید شده در مطالعه *فاصل* و همکاران [13] استفاده شد. به این ترتیب که بعد از الکتروفورز پروتئین ها روی ژل پلی آکریلامید، عمل انتقال به کاغذ نیتروسولوز انجام شد. کاغذ نیتروسولوز به مدت یک ساعت در بافر PBS حاوی ۱٪ شیر بدون چربی قرار گرفت. بعد از این مرحله کاغذ نیتروسولوز به وسیله بافر PBS شست و شو و به مدت یک ساعت در بافر PBS حاوی آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی با غلظت ۱:۵۰۰ و در دمای اتاق قرار گرفت. عمل شست و شو با بافر PBS حاوی ۰/۰۵٪ حجمی/حجمی توئین ۲۰ برای سه مرتبه تکرار شد. سپس آنتی بادی ثانویه ضد ایمونوگلوبولین خرگوش که با پراکسیداز کوئزوک شده بود (رازی بیوتک؛ ایران) با رقت ۱:۲۰۰۰ در بافر PBS استفاده شد. کاغذ نیتروسولوز در این بافر به مدت یک ساعت و در دمای اتاق تیمار شد. از محلول حاوی ۰/۰۵٪ دی آمینوبنزیدين و ۰/۰۱۵٪ آب اکسیژنه در بافر PBS، برای ظهور باند پروتئین در کاغذ نیتروسولوز استفاده شد. از سلول های میزبان اولیه بدون وجود ناقل بیانی به عنوان کنترل منفی برای این مرحله استفاده شد.

تعیین غلظت نمونه پروتئین خالص شده به روش برادفورد: به منظور تعیین مقدار پروتئین تام یا خالص شده از روش برادفورد استفاده شد [15]. در هر آزمایش تعیین مقدار پروتئین، از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. برای انجام آزمون برادفورد، ۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی به یک تیوب افزوده شده و سپس مقدار یک میلی لیتر محلول کوماسی بلو G-250 به آن اضافه شد. سپس جذب نمونه در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد. اعداد جذب خوانده شده در منحنی استاندارد قرار گرفت و غلظت پروتئین خالص شده به دست آمد.

تعیین فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم اورات اکسیداز با استفاده از روش ذکر شده در مطالعات قبلی سنجیده شد. به طور خلاصه، آنزیم اورات اکسیداز، اسیداوریک را به آلانتوئین و آب اکسیژنه تبدیل می نماید. آب اکسیژنه به همراه ۴-آمینوآنتی پیرین به عنوان سوپسترای پراکسیداز منجر به ایجاد رنگ در محلول شده و سپس واکنش با افزودن اسیدپرکلریک (HClO₄ ۰/۶ میلی مولار) متوقف می شود. رنگ تولید شده با میزان اورات اکسیداز رابطه مستقیم دارد. از طریق قراردادن اعداد در منحنی استاندارد رسم شده از آنزیم شاهد (داروی موجود در بازار) فعالیت آنزیم تولیدی سنجیده شد.



شکل ۱) تصویر شماتیک از ساختار ژن کدکننده آنزیم اورات اکسیداز در پایین دست پروتئین شبه الاستین و اینتئین

پروتئین ها از طریق اندازه گیری وزن توده سلولی و اندازه گیری مقدار پروتئین، مقادیر یکسان از پروتئین تام برای الکتروفورز استفاده شد. در نهایت، پروتئین هدف در حدود ۳۵ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۲).

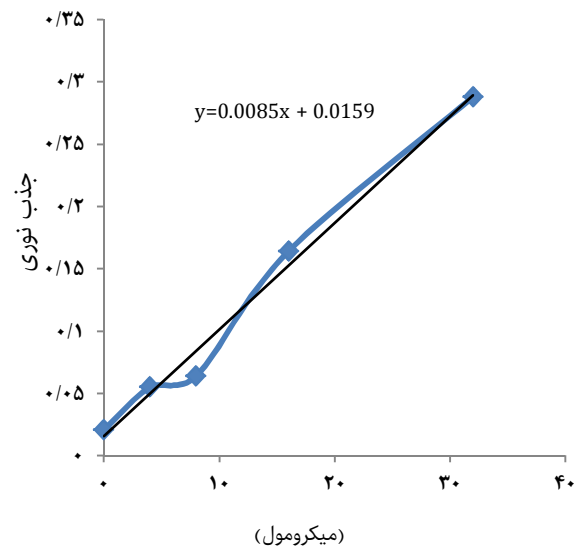
سلول باکتریایی به دست آمده از یک لیتر محیط کشت پس از بیان پروتئین جمع آوری و توزین شد. این مقادیر معادل ۲ گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود. بعد از لیز باکتری ها، پروتئین تام سلولی در ژل پلی آکریلامید ۱۰٪ الکتروفورز شد؛ پس از رنگ آمیزی باند

میزان جذب اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵ نانومتر از غلظت‌های مختلف نمونه استاندارد آنزیم اورات اکسیداز تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱) میزان جذب اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵ نانومتر از غلظت‌های مختلف نمونه استاندارد آنزیم اورات اکسیداز

غلظت استاندارد (میکرومول)	جذب در ۵۰۵ نانومتر
۰	۰/۰۲۱
۴	۰/۰۵۵
۸	۰/۰۶۴
۱۶	۰/۱۶۴
۳۲	۰/۲۸۸

منحنی استاندارد مربوطه براساس اعداد جذب متناظر هر غلظت رسم شد (نمودار ۱).

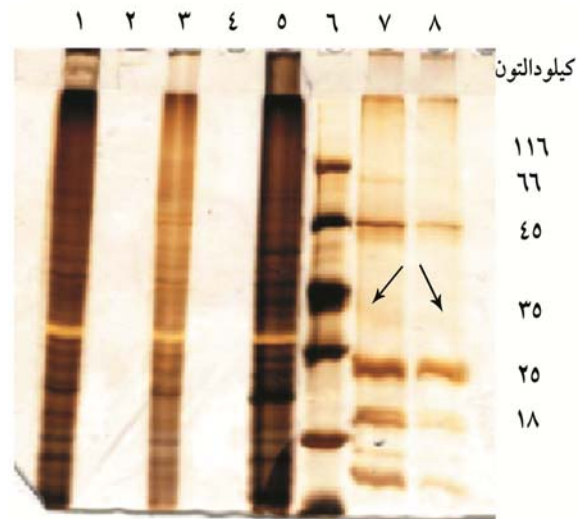


نمودار ۱) منحنی استاندارد حاصل از واکنش غلظت‌های مختلف آنزیم اورات اکسیداز در واکنش آنزیمی به‌روش رنگ‌سنجی

مطابق با معادله خط حاصل از منحنی استاندارد، فعالیت آنزیمی پروتئین خالص‌شده در مقایسه با نمونه استاندارد محاسبه شد. جذب یک نمونه از پروتئین خالص‌شده برابر با ۰/۴۲۴ بود که پس از قرارگرفتن در معادله خط غلظتی معادل ۴۸/۰۱ میکرومول به دست آمد. بر این اساس در نمونه خالص‌شده با حجم یک‌میلی‌لیتر معادل ۴۸ میکرومول پروتئین وجود داشت که این مقدار با توجه به وزن مولکولی پروتئین هدف که برابر با ۳۵ کیلوالتون بود، معادل ۱/۶۴ میلی‌گرم پروتئین است.

بحث

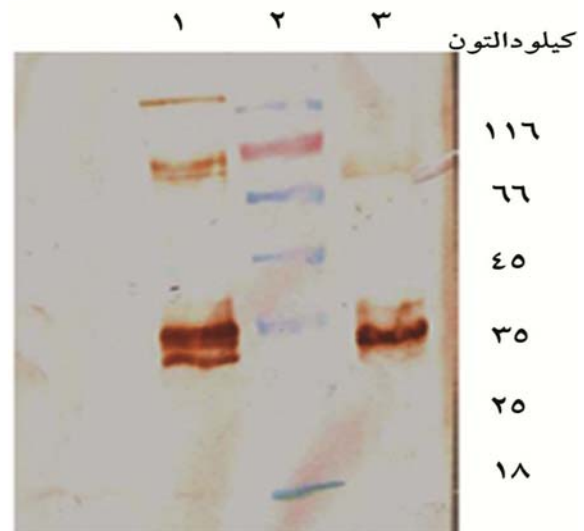
هدف پژوهش حاضر همسانه‌سازی، بیان و خالص‌سازی اورات اکسیداز نوترکیب با استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین بود. فرآیند پایین‌دستی در صنعت دارویی زیستی شامل مراحل مختلف از جمع‌آوری سلول از فرمانتور تا دستیابی به پروتئین خالص نهایی یا ماده اولیه دارویی برای فرمولاسیون نهایی است. این بخش از فرآیند تولید در صنعت معمولاً بخش عمده هزینه‌های تولید را در بر می‌گیرد. به همین دلیل کاهش هزینه‌های فرآیند پایین‌دستی یکی از اهداف تحقیقاتی شرکت‌های دارویی برای برنامه‌های تحقیق و توسعه است. در این میان قسمت عمده و هزینه‌بر از فرآیند پایین‌دستی، فرآیند خالص‌سازی یا تخلیص است.



شکل ۲) تصویر الکتروفورز پروتئین در ژل آکرلامید ۱۰٪ بعد از رنگ‌آمیزی نیترات نقره

چاهک ۱: بخش نامحلول از لیز باکتری پس از سانتریفوژ؛ چاهک ۲: چاهک خالی؛ چاهک ۳: بخش محلول از لیز باکتری پس از سانتریفوژ؛ چاهک ۴: چاهک خالی؛ چاهک ۵: نمونه لیز سلولی تام شامل بخش محلول و نامحلول؛ چاهک ۶: شاخص وزن مولکولی پروتئین؛ چاهک ۷: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از یک مرحله خالص‌سازی؛ چاهک ۸: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از دوبار تکرار فرآیند خالص‌سازی

بعد از یک مرحله انجام مراحل خالص‌سازی و برش به‌وسیله توالی اینتئین تا حدود ۸۰٪ خلوص حاصل شد. در ادامه با انجام مجدد فرآیند، این درجه خلوص به بیش از ۹۰٪ افزایش یافت (شکل ۲). در هر آزمون باند پروتئین نوترکیب بیان‌شده حدود ۳۵ کیلوالتون مشاهده شد و به‌وسیله وسترن بلات تایید شد (شکل ۳).



شکل ۳) تصویر وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی نمونه ۱: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از یک مرحله خالص‌سازی؛ نمونه ۲: شاخص وزن مولکولی پروتئین؛ نمونه ۳: آنزیم خالص‌شده به‌روش رسوب به‌واسطه پروتئین شبه‌الاستین و برش اینتئین بعد از دوبار تکرار فرآیند خالص‌سازی

براساس روش برادفورد و منحنی استاندارد رسم‌شده، مقدار پروتئین خالص‌شده معادل ۱/۸۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به حجم نمونه موجود و مقدار پروتئین تام اولیه، این مقدار معادل ۳/۷۸ میلی‌گرم به ازای یک لیتر محیط کشت مایع بود.

داروسازی مرسوم است که این روش اخیر نیز می‌تواند کاندید استفاده در صنایع به‌طور همزمان با سایر روش‌های رسوب‌دهی یا به‌صورت روش مستقل باشد.

همان‌طور که در مطالعات قبل مشخص شده است، پروتئین شبه‌الاستین قابلیت اتصال به پروتئین‌های هترولوگ و ایجاد خاصیت تغییر حلالیت در شرایط بافری مختلف را دارد [13]. در همین راستا ژن کدکننده اورات‌اکسیداز به‌صورت فیوژن با این پروتئین طراحی و بیان شد. به‌منظور سهولت در فرآیند خالص‌سازی در حد فاصل پروتئین هدف و توالی پروتئین شبه‌الاستین از توالی دیگری به نام اینتئین استفاده شد. توالی اینتئین نیز دارای خاصیت برش خودبه‌خودی است که در شرایط بافری مختلف و در حضور ترکیبات احیاکننده مانند مرکاپتواتانول، سبب ایجاد برش در توالی خاص از اسیدآمینه می‌شود. در گذشته نیز از توالی اینتئین همراه با توالی متصل‌شونده به کیتین برای بیان و خالص‌سازی اورات‌اکسیداز استفاده شده است [21]. لیکن این محققان از توالی متصل‌شونده به کیتین استفاده نموده‌اند که مستلزم به‌کارگیری ستون کروماتوگرافی جذبی بود. آنچه تحقیق حاضر را متفاوت از سایر مطالعات کرد به‌کارگیری توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین به‌طور همزمان برای حذف روش کروماتوگرافی از فرآیند تخلیص اورات‌اکسیداز است. به این ترتیب با طراحی این ساختار و بیان پروتئین اورات‌اکسیداز همراه با توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین از طرفی خالص‌سازی پروتئین هدف، تسریع شد و از طرفی حذف پروتئین همراه یا فیوژن که معمولاً خود از فرآیندهای وقت‌گیر و هزینه‌بر است با تغییر در بافر انجام شد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر، برش زودهنگام توالی اینتئین است که در زمان بیان پروتئین و قبل از خالص‌سازی اتفاق می‌افتد. در برخی از مقالات به‌منظور اصلاح این فرآیند از توالی اینتئین به‌صورت دو قطعه جداگانه استفاده شد. این قطعات بعد از بیان به یکدیگر متصل و پروتئین فعال حاصل می‌شود.

گرچه در عمل میزان خلوص نهایی ۸۰ تا ۹۰٪ به دست آمد، ولی نمی‌توان این درصد از خلوص را مناسب برای فرآورده دارویی در نظر گرفت. هر چند در بسیاری از فرآورده‌های غیردارویی یا دارای مصرف غیرانسانی و همچنین فرآورده‌های موضعی، این درصد از خلوص قابل قبول بوده و قابلیت استفاده به‌عنوان فرآورده را خواهد داشت. هر یک از این روش‌ها در نهایت برای استفاده در صنعت نیاز به بررسی امکان‌سنجی و اعتبارسنجی دارد که پیشنهاد می‌شود ابتدا در فرآیندهایی با مقیاس کم و در صنایع دارای ریسک کمتر مورد استفاده قرار گیرد. در صورت مناسب‌بودن از جنبه‌های صنعتی و اقتصادی، روش اخیر می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های جاری خالص‌سازی باشد و به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

استفاده از توالی اینتئین و پروتئین شبه‌الاستین به‌صورت همراه با آزریم اورات‌اکسیداز به بیان و خالص‌سازی این آزریم بدون نیاز به روش کروماتوگرافی کمک می‌کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مسئولان انستیتو پاستور به‌خاطر فراهم‌آوردن امکان اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از کارکنان بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تشکر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش بدون نیاز به تاییدیه اخلاقی به

در بیش از ۹۵٪ از موارد در مراحل تخلیص و تولید داروهای زیستی از یک یا چند مرحله خالص‌سازی به‌روش کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود. این موضوع سبب شده است که فرآیندهای خالص‌سازی غیرکروماتوگرافی مورد توجه قرار گیرد. طیف وسیعی از این روش‌ها شامل استفاده از روش‌های رسوب با نمک رسوب، به‌وسيله ترکیبات شیمیایی، استفاده از ترکیبات دوفازی مانند پلی‌اتیلن گلیکول و غیره مورد استفاده قرار گرفته است.

یکی از روش‌های جدید، استفاده از توالی پروتئین است که در طبیعت یافت می‌شود و در غلظت‌های مختلف نمک یا اسیدیته مختلف، رفتار متفاوتی به‌صورت محلول یا غیرمحلول از خود نشان می‌دهد. استفاده از این توالی به‌صورت فیوژن با پروتئین هدف می‌تواند به‌منظور خالص‌سازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد [16].

فونگ و همکاران، در بررسی اثرات pH و دما روی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین در خالص‌سازی پروتئین به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از نمک سدیم کلراید می‌تواند اثرات بهتری نسبت به استفاده از سایر ترکیبات برای رسوب پروتئین شبه‌الاستین داشته باشد. همچنین استفاده از نمک نه‌تنها نتایج بهتری نسبت به عوامل اسیدی و بازی نشان داد، بلکه از نظر اقتصادی نیز نسبت به سایر روش‌ها مقرون به‌صرفه بود [17].

همچنین فونگ و همکاران به بررسی میزان بازده استفاده از پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین برای خالص‌سازی بتا-گالاکتوزیداز در روش‌های مختلف کشت باکتری پرداخته‌اند. در این تحقیق میزان بازده خالص‌سازی در استفاده از فلاسک کشت بین انواع سوبیه‌های مختلف باکتری و محیط‌های کشت متفاوت مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما میزان بازده بیان در روش فلاسک نسبت به کشت بچ در فرمانتور مقادیر بیشتری را نشان داده است. در ادامه زمانی که از روش کشت فد- بچ استفاده شده بود، میزان بازده و مقدار پروتئین خالص‌شده به ازای لیتر محیط کشت افزایش قابل توجهی داشته است [18]. یکی از دلایل این افزایش، میزان چگالی سلول پس از اتمام فرآیند تخمیر است که میزان توده زیستی افزایش قابل توجهی نسبت به روش فلاسک یا روش کشت بچ داشته است. نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر نشان داد که مقدار ۱/۶۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در انتهای فرآیند خالص‌سازی قابل دستیابی است. هر چند این مقدار کمتر از مقادیر ذکرشده در مقالات قبل بود، ولی بهینه‌سازی فرآیندهای کشت و القا و نیز بررسی شرایط مختلف محیطی قابل بررسی و ارزیابی بیشتر بود که پیش‌بینی می‌شود تاثیر زیادی بر بازده تخلیص داشته باشد.

یکی از معایبی که در مورد استفاده از توالی پروتئین شبه‌الاستین و اینتئین در فرآیند تخلیص پروتئین وجود دارد، برش زودهنگام این توالی در زمان بیان پروتئین و قبل از خالص‌سازی است. به‌منظور اصلاح این فرآیند از توالی اینتئین به‌صورت دو قطعه جداگانه در فرآیند بیان استفاده شد. این توالی در ادامه و در طول فرآیند خالص‌سازی ابتدا به مولکول کامل تبدیل و سپس از خاصیت برش مولکول اینتئین استفاده می‌شود [19, 20].

در مورد فرآورده‌های دارویی انسانی خصوصاً از نوع تزریقی هنوز لازم است مراحل مختلفی از انواع کروماتوگرافی ستونی مورد استفاده قرار گیرد، هر چند استفاده از روش‌های غیرکروماتوگرافی مانند روش‌های رسوب‌دهی به‌عنوان مراحل اولیه تخلیص قابل استفاده بوده و بخش عمده‌ای از ناخالصی‌ها با این روش‌ها قابل جداسازی است. استفاده از این نوع روش‌ها به‌صورت روتین در صنایع

Santisteban I, Scarlett E, et al. Treating gout with pegloticase, a PEGylated urate oxidase, provides insight into the importance of uric acid as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(32):14351-6.

10- Coiffier B, Mounier N, Bologna S, Fermé C, Tilly H, Sonet A, et al. Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of the GRAAL1 (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Trial on Rasburicase Activity in Adult Lymphoma) study. *J Clin Oncol*. 2003;21(23):4402-6.

11- Lan D, Huang G, Shao H, Zhang L, Ma L, Chen Sh, et al. An improved nonchromatographic method for the purification of recombinant proteins using elastin-like polypeptide-tagged proteases. *Anal Biochem*. 2011;415(2):200-2.

12- Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*. 2005;2(9):659-61.

13- Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, Namvaran MM, Enayati S, Mirabzadeh Ardakani E, et al. Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris*. *Springerplus*. 2014;3:395.

14- Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1st Volume. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

15- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.

16- Banki MR, Gerngross TU, Wood DW. Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Sci*. 2005;14(6):1387-95.

17- Fong BA, Wu WY, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein Expr Purif*. 2009; 66(2):198-202.

18- Fong BA, Wood DW. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. *Microb Cell Fact*. 2010;19:77.

19- Shi C, Han TC, Wood DW. Purification of microbially expressed recombinant proteins via a dual ELP split intein system. *Methods Mol Biol*. 2017;1495:13-25.

20- Guan D, Chen Z. Affinity purification of proteins in tag-free form: Split intein-mediated ultrarapid purification (SIRP). *Methods Mol Biol*. 2017;1495:1-12.

21- Alishah K, Asad S, Khajeh K, Akbari N. Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme. *Enzyme Microb Technol*. 2016;93-94:92-8.

تصویب شورای پژوهشی انستیتو پاستور رسیده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه منافع مالی و معنوی در خصوص نتایج این پروژه ندارند.

سهم نویسندگان: محمد عزیزی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ سمیه عنایتی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ مریم سلماسی‌زاده (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ نجمه زارعی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ وحید خلیج (نویسنده پنجم)، پژوهشگر اصلی (۲۰٪).

منابع مالی: این پروژه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و در قالب طرح مصوب به شماره ۹۰۹ اجرا شد.

منابع

1- Goldman SC, Holcenberg JS, Finklestein JZ, Hutchinson R, Kreissman S, Johnson FL, et al. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis. *Blood*. 2001;97(10):2998-3003.

2- Pui CH, Jeha S, Irwin D, Camitta B. Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: Results of a compassionate-use trial. *Leukemia*. 2001;15(10):1505-9.

3- FitzGerald O, Fitzpatrick DA, McGeeney KF. Letter: Urate-oxidase treatment for hyperuricaemia. *Lancet*. 1975;1(7905):525.

4- Leplatois P, Le Douarin B, Loison G. High-level production of a peroxisomal enzyme: *Aspergillus flavus* uricase accumulates intracellularly and is active in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1992;122(1):139-45.

5- Giffard M, Ferté N, Ragot F, El Hajji M, Castro B, Bonneté F. Urate oxidase purification by salting-in crystallization: Towards an alternative to chromatography. *PLoS One*. 2011;6(5):e19013.

6- Chen Z, Wang Z, He X, Guo X, Li W, Zhang B. Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;79(4):545-54.

7- Li J, Chen Z, Hou L, Fan H, Weng S, Xu C, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2006;49(1):55-9.

8- Pfrimer P, de Moraes LM, Galdino AS, Salles LP, Reis VC, De Marco JL, et al. Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:674908.

9- Hershfield MS, Roberts LJ 2nd, Ganson NJ, Kelly SJ,