Archive of SID

مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤، شمـاره‌ی ۱۰٦، آذر و دی ۱۳۹۵، صفحات ۱۰۹ تا ۱۲۱

کلونینگ و بیان آنزیم درمانی اوریکاز *آسپرژیلوس فلاووس* در *اشریشیاکلی*

دکتر مهدی ایمانی[۱]، دکتر محمد پاژنگ[۲]، سمیه میرزائی‌نیا[۳]

نویسنده‌ی مسوول: بخش بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه m.imani@urmia.ac.ir

دریافت: ۹۴/۷/۷ پذیرش: ۹۴/۱۰/۷

چکیده

زمینه و هدف: *اوریکاز (EC 1.7.3.3) آنزیمی است که باعث کاتالیز اوریک اسید به H_2O_2 و الانتوئین می‌شود و در درمان نقرس استفاده می‌شود. هدف این تحقیق کلون‌سازی ژن سنتتیک کدکننده‌ی آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاوس در پلاسمید pET-28a(+) و بیان نوترکیب آن در اشریشیاکلی می‌باشد.*

روش بررسی: *بعد از استخراج توالی ژنی از پایگاه داده‌ها، ژن کدکننده‌ی اوریکاز بهینه سازی شد و سنتز آن سفارش داده شد. سپس ژن سنتتیک در پلاسمید pET-28a(+) در بین آنزیم‌های NcoI و XhoI ساب-کلون شد و توسط روش‌های هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی کلون‌سازی صحیح آن تایید شد. بعد از انتقال آن به باکتری Bl21 به روش شیمیایی والقا آن توسط IPTG، بیان آن بهینه‌سازی شد. برای ارزیابی القا آنزیم نوترکیب، ژل الکتروفورز پروتئین استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی نشان داد که آنزیم اوریکاز به‌طور صحیح در جایگاه مورد نظر کلون‌سازی شده است. دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان ۶ ساعت با غلظت IPTG ۱ میلی‌مول برای بهینه‌سازی بیان آنزیم به‌دست آمد. نتایج الکتروفورز آنزیم نوترکیب، جرم مولکولی ۳۴/۵ کیلودالتون را برای آنزیم بیان شده نشان داد. تعیین فعالیت آنزیمی مشخص کرد که فعالیت ویژه‌ی آنزیم اوریکاز ۷/۶۹ واحد بر میلی‌گرم است و آنزیم به لحاظ عملکردی فعال است.*

نتیجه‌گیری: *نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ژن اوریکاز را می‌توان به آسانی در سیستم بیانی pET کلون و بیان کرد. نتایج تعیین فعالیت ویژه مشخص کرد که پروتئین آنزیمی به‌صورت محلول در سیتوزول اشریشیا کلی تولید شده است و از نظر کاتالیتیکی فعال است.*

واژگان کلیدی: نقرس، اوریکاز سنتتیک، آسپرژیلوس فلاوس، نوترکیب، اشریشیا کلی

مقدمه

نقرس بیماری است که در آن سطح اسید اوریک خون افزایش می‌یابد و موجب بروز التهاب مفاصل و کلیه می‌شود. اسید اوریک در آب محلول است و به‌طور طبیعی توسط کلیه‌ها به میزان ٦۰۰ تا ۷۰۰ میلی‌گرم در روز از بدن خارج می‌شود. هرگاه میزان اسید اوریک در مردان از ٦ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و در زنان از ۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بیشتر شود هیپراوریسمی رخ می‌دهد (۱). نقرس خود را با افزایش اسیداوریک خون، التهاب دردناک مفاصل، رسوب کریستال‌های اورات سدیم و سنگ‌های کلیوی اسیداوریکی نشان می‌دهد (۳و۲). اسید اوریک به‌طور طبیعی محصول

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار بخش بیوشیمی، گروه علوم پایه، ، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

www.SID.ir

Archive of SID

کاتابولیسم نوکلئوتیدهای پورین می‌باشد. ابتدا آدنوزین توسط آنزیم دآمیناز به اینوزین تبدیل می‌شود که این محصول نیز به نوبه‌ی خود به هیپوگزانتین تبدیل می‌شود. هیپوگزانتین توسط آنزیم هیپوگزانتین اکسیداز به گزانتین تبدیل می‌شود که با اکسید شدن توسط آنزیم گزانتین اکسیداز به اسید اوریک تبدیل می‌شود. اسید اوریک ترکیبی است که pKa آن برابر ۵/٤ می‌باشد (٤).

آنزیم اورات اکسیداز یا اوریکاز (EC 1.7.3.3) آنزیمی است که در بسیاری از گونه‌های جانوری از میکروارگانسیم‌ها تا پستانداران حفظ شده است. محصول نهایی متابولیسم پورین‌ها در این موجودات، آلانتوئین، اوره و آمونیاک می‌باشد. با وجود این در پرایمات‌های هومینوئید مثل شامپانزه، گوریل‌ها و اورانگوتان ها و نیز در انسان به دلیل جهش‌های تکاملی، آنزیم فاقد فعالیت بوده و محصول نهایی متابولیسم پورین‌ها اسید اوریک است آنزیم اورات اکسیداز در ساختار خود دارای مس می‌باشد که باعث کاتالیز واکنش تبدیل اسید اوریک به آلانتوئین و آب اکسیژنه (H_2O_2) می‌شود. این نوع واکنش در واقع باز شدن اکسیداتیو حلقه‌ی پورین می‌باشد. آلانتوئین ۵ تا ۱۰ برابر در آب محلول‌تر از اسید اوریک است (٦و۵). آنزیم اوریکاز می‌تواند در کاهش تجمع اورات سمی مورد استفاده قرار گیرد. راسبوریکاز یا الیتک (Elitek) نام تجاری برای اورات اکسیداز نوترکیب *آسپرژیلوس فلاوس* می‌باشد که در *ساکارومایسس سرویزیه* بیان شده است و امروزه به‌صورت کلینیکی استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که راسبوریکاز بسیار موثرتر از سایر داروهای رایج در درمان هیپراوریسمی است. علاوه بر درمان هیپراوریسمی از این دارو به‌طور رایج در درمان سندرم لیز توموری نیز استفاده می‌شود (۹-۷). مطالعات زیادی بر روی آنزیم نوترکیب راسبوریکاز (آنزیم *آسپرژیلوس فلاوس*) انجام شده است. به‌طوری که در یکی از این مطالعات، این آنزیم به خوبی میزان اسید اوریک خون بیماران مبتلا به لوسمی را بدون هیچ عوارضی پایین آورده است (۸). از دیدگاه بیوشیمیایی، آنزیم اورات اکسیداز *آسپرژیلوس فلاوس* با جرم مولکولی ۳٤/۵ کیلودالتون دارای ۳۰۲ اسیدآمینه می‌باشد این آنزیم به صورت هموتترامر با جرم مولکولی ۱۳۵ کیلودالتون فعالیت دارد و ساختار کریستالی آن توسط گروه‌های مختلف تحقیقاتی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است (۱۳-۱۰).

ژن کد کننده‌ی آنزیم اوریکاز وحشی *آسپرژیلوس فلاووس* برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ کلون و در *اشریشیاکلی* با موفقیت بیان شد (١٤). کلونینگ و بیان طبیعی و نوترکیب آنزیم اوریکاز در میزبان‌های مخمری مثل *ساکارومایسیس سرویزیه* و *پیشیاپاستوریس* و همچنین میزبان باکتریایی انجام شده است. بیان در مخمر مستلزم صرف هزینه و زمان زیادی در مقایسه با بیان باکتریایی می‌باشد. علیرغم موفقیت‌های چشمگیر در بیان و فعالیت آنزیم مذکور در تمامی تحقیقات فوق آنزیم توسط روش‌های کروماتوگرافی چندمرحله‌ای تخلیص می‌شود. بنابراین هدف از این تحقیق بهینه‌سازی کدون آنزیم اوریکاز *آسپرژیلوس فلاوس* بر اساس کدون *اشریشیاکلی*، کلون‌سازی آن در پلاسمید بیانی pET-28a(+) و بیان نوترکیب در *اشریشیاکلی* و بررسی فعالیت آنزیم تولید شده می‌باشد.

روش بررسی

مواد شیمیایی و آنزیم‌ها: آنزیم DNA Taq پلیمراز، مخلوط dNTP، نردبان 1Kb DNA (با کد SL5051) از شرکت سیناکلون، آنزیم‌های *NcoI* و *XhoI*، DNA T4 لیگاز، ایزوپروپیل -β-D-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، و مارکر پروتئینی (SM0431) از شرکت فرمنتاز، کیت‌های استخراج پلاسمید و استخراج اسید نوکلئیک از ژل از شرکت تکاپو زیست، تریپتون، و عصاره‌ی مخمر از شرکت شارلو، نمک سدیمی اسید اوریک (U2875)، کانامایسین، آمپی‌سیلین، از شرکت‌سیگما و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک تهیه شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم‌ها و پلاسمیدها: سویه‌های DH5α و Bl21 (DE3) *اشریشیاکلی* از مرکز تحقیقات پاستور تهران تهیه و به‌ترتیب به‌عنوان میزبان برای تکثیر پلاسمید و کلونینگ و بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق *pET-28a(+)* بود که از مرکز تحقیقات پاستور تهران تهیه شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این پروژه آمپی‌سیلین و کانامایسین بود که در محیط کشت مایع و جامد با غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شدند.

طراحی و بهینه‌سازی ژن کد کننده‌ی آنزیم اوریکاز: به‌منظور کلون‌سازی ژن کد کننده‌ی آنزیم اوریکاز *آسپرژیلوس فلاوس* توالی ژنی آن از بانک ژن با کد دسترسی X61766.1 استخراج و کدون آن توسط سرور http://eu.idtdna.com/CodonOpt برای بیان در باکتری *اشریشیاکلی* Bl21 بهینه‌سازی شد و برای سنتز ژن به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال شد. علاوه بر توالی کد کننده‌ی آنزیم، در سمت '5 ژن محل برش برای آنزیم *Nco*I و در سمت '3 به ترتیب محل برش برای آنزیم‌های XhoI، *Nco*I، و *HindIII* گذاشته شد. به‌علاوه قبل از محل برش آنزیم *XhoI*، توالی کد کننده برای برچسب هیستیدین (6xHis) و کدون پایان نیز قرار داده شد. در نهایت ژن سنتتیک با نام *AFUOX* و به طول ۹۶۷ جفت باز برای سنتز در وکتور کلونینگ *pGEM-B1* سفارش داده شد.

ساخت وکتور بیانی: به‌منظور ساخت وکتور بیانی ابتدا ژن سنتتیک اوریکاز از *pGEM-B1* توسط آنزیم‌های *NcoI* و *XhoI* جدا شده و سپس در وکتور *pET-28a(+)* کلون شد. محل کلونینگ طوری انتخاب شد که برچسب هیستیدین در بخش کربوکسیل آنزیم بیان شده واقع شود. پلاسمید ساخته شده pET-28a(+)-AFUOX نامگذاری شد. سپس وکتور ساخته شده با روش شیمیایی به باکتری DH5α منتقل شد تا به مقدار کافی تکثیر شود. سپس وکتورهای تکثیر یافته با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، استخراج شدند (۱۵).

کشت باکتری: یک کلونی از باکتری *اشریشیاکلی* مورد نظر را در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۶۰ دور بر دقیقه به مدت یک شب در ۱۰ سی‌سی محیط کشت اولیه LB در انکوباتور شیکردار تلقیح شد. سپس ۱ سی‌سی از محیط کشت اولیه به ۱۰۰ سی‌سی محیط LB جدید (۱ به ۱۰۰) اضافه گردید. رشد باکتری‌ها با همان شرایط دمایی و دور چرخش به‌مدت ٤ تا ۵ ساعت ادامه پیدا کرد. محیط کشت حاوی باکتری تا رسیدن به‌جذب نوری ۰/۵ تا ۰/۷ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. در این بازه‌ی جذبی باکتری‌ها در اوایل مرحله‌ی رشد لگاریتمی هستند. این مرحله بهترین زمان برای مستعد کردن باکتری‌ها است (۱۵).

تهیه‌ی باکتری‌های مستعد: محیط حاوی باکتری در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۶۰ دور بر دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب باکتریایی دو بار با کلسیم کلراید سرد ۱۰۰ میلی‌مول شسته شد و هر بار به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی، برای بار سوم رسوب با کلسیم کلراید سرد مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای صفر درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوبه کردن، محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با ۱۶۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از حذف مایع رویی، شناور کردن باکتری‌ها در کلسیم کلراید و گلیسرول ۱۵ درصد صورت گرفت. جهت اطمینان از زنده ماندن باکتری‌ها، آن‌ها روی محیط LB جامد بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند (۱۵).

انتقال پلاسمید: انتقال پلاسمید به روش شیمیایی صورت گرفت. برای انتقال محصول لیگاسیون، ۵ میکرولیتر از آن به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *اشریشیاکلی* مستعد افزوده شد. سپس میکروتیوب حاوی باکتری‌های مستعد به مدت ۵۰ دقیقه در دمای صفر درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور ایجاد شوک حرارتی، انکوبه کردن باکتری‌ها به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ٤٥ ثانیه در دمای ٤٢ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. جهت رشد بهتر باکتری‌های ترانسفورم شده ۱ سی‌سی محیط مغذی SOC به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. سپس محتوی میکروتیوب به مدت ۳ دقیقه در ٤۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط SOC معلق گردید. سپس روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. از یک پلاسمید کامل به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی برای ترانسفورماسیون استفاده شد (۱۵).

بررسی کلونینگ: بعد از استخراج وکتور بیانی ساخته شده، ورود ژن اوریکاز در آن توسط سه روش، هضم آنزیمی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تعیین توالی صورت گرفت. جهت بررسی ورود ژن اوریکاز به پلاسمید *pET-28a(+)* پلاسمید ساخته شده توسط دو آنزیم محدود کننده *Nco*I و *Xho*I هضم شد. در روش PCR الیگونوکلئوتید اختصاصی پیشرو به صورتی طراحی شده بود که در صورت قرارگیری ژن در فریم صحیح، الیگونوکلئوتید به پلاسمید متصل شده و واکنش تکثیر شروع شود. دوازده نوکلئوتید انتهای '3 آن که برای اتصال به ژن ضروری است مکمل توالی ژن اوریکاز و آنزیم *NcoI* و پنج نوکلئوتید '5 آن یعنی GATAT مکمل توالی وکتور است. الیگونوکلئوتید معکوس برای ترمیناتور T7 طراحی شده بود. توالی دو پرایمر سنتز شده به صورت زیر می‌باشد: پرایمر رفتی '5 GATATACCATGGCAGCCG '3 و پرایمر برگشتی '5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG '3. توالی پررنگ شده در پرایمر رفتی توالی برش آنزیم *NcoI* را نشان می‌دهد. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند.

بعد از هضم آنزیمی و PCR محصولات آن‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. تعیین توالی پلاسمید ساخته شده، توسط شرکت بیونیر کره جنوبی توسط الیگونوکلئوتیدهای جهانی پروموتور T7 و ترمیناتور T7 انجام شد.

استخراج و برش پلاسمید: در طی مراحل تحقیق استخراج پلاسمید در مقدار کم انجام شد. این عمل با استفاده از روش لیز قلیایی توسط کیت استخراج پلاسمید با هدف لیز کردن باکتری‌ها و استخراج پلاسمید صورت گرفت. برای اطمینان از حضور ژن کدکننده‌ی آنزیم اوریکاز در داخل پلاسمید *pET-28a(+)* این پلاسمید توسط آنزیم‌های محدودکننده *NcoI* و *XhoI* برش داده شد. برای برش، ۸ میکرولیتر از پلاسمید استخراج‌شده با ۱ میکرولیتر از هر آنزیم *NcoI* و *XhoI* مخلوط شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و پلاسمیدهای برش داده شده و استخراجی جهت رویت روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شدند. ظاهرسازی مولکول‌های DNA توسط اتیدیوم بروماید انجام گرفت. به‌دلیل حضور این ماده مولکول‌های اسیدنوکلئیک در برابر تابش نور UV خاصیت فلورسانسی پیدا می‌کند. در مراحل مختلف تحقیق اندازه‌گیری غلظت پلاسمید، با قرائت جذب محلول پلاسمیدی در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ ساخت شرکت ترموساینتیفیک انجام شد (۱۵).

بیان آنزیم اوریکاز نوترکیب: جهت بیان آنزیم نوترکیب، بعد از اطمینان از ورود ژن در وکتور بیانی، وکتور ساخته شده با روش شیمیایی به باکتری *ایشرشیاکلی* Bl21 منتقل شد. سپس یک کلنی از باکتری *Bl21* حاوی وکتور بیانی ساخته شده انتخاب و در ۱۰ سی‌سی محیط کشت اولیه LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید. سپس ۱ سی‌سی از محیط کشت اولیه به دو فلاسک حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط LB جدید حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین اضافه و تا رسیدن به جذب نوری ۰/۵تا۰/۷ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور

www.SID.ir

Archive of SID

۱۶۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. بعد از رسیدن به کدورت مطلوب ۱ سی‌سی از محیط به‌عنوان نمونه بدون القا و شاهد برداشته شده و به باقی مانده محیط IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه گردید. سپس یکی از فلاسک‌ها در دمای۲۲ درجه‌ی سانتی گراد و دومی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در بازه‌های زمانی ۲، ۴، ۶، و ۸ ساعت از آن‌ها نمونه‌برداری شد تا بیان بهینه به‌دست آید (نتایج مربوط به بهینه‌سازی بیان نشان نداده شده است)(۱۶).

لیز باکتری‌های حاوی آنزیم نوترکیب اوریکاز: محلول باکتری‌های بیان‌کننده پروتئین موردنظر در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و رسوبات باکتریایی در بافر لیز کننده (شامل ۵۰Tris-HCl میلی‌مولار، ۳۰۰NaCl میلی‌مولار، و PMSF ۱ میلی‌مولار) معلق گردید. محلول به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. قبل از لیز باکتری‌ها جهت حفاظت از پروتئین DTT و EDTA با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه شد. نهایتاً، بعد از ذوب محلول در حمام آب ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، باکتری‌های بیان‌کننده توسط دستگاه سونیکاتور در ۳۰ چرخه‌ی ۳۰ ثانیه‌ای با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز تحت لیز مکانیکی قرار گرفتند (۱۷).

تعیین غلظت پروتئین و الکتروفورز: برای سنجش غلظت کل پروتئین موجود در محلول باکتریایی لیز شده از روش سنجش پروتئین برادفورد استفاده شد (۱۸). از BSA به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. جهت مشاهده الگوی پروتئینی باکتری و بیان آنزیم از الکتروفورز ژل پروتئین پلی‌آکریلامید ۱۲درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل توسط کوماسی بلو R250 انجام شد (۱۵).

تعیین فعالیت آنزیم: .جهت تعیین فعالیت آنزیم، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم (عصاره‌ی سلولی حاوی آنزیم) به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی سوبسترا (اسیداوریک ۳۰ میلی‌مولار، تریس ۲۰ میلی مولار pH۷) اضافه شد. بعد از انکوباسیون در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، جذب نوری محلول در طول موج ۲۹۳ نانومتر تعیین گردید. این نوع تعیین فعالیت آنزیمی براساس کاهش مقدار اسید اوریک بوده که میزان این کاهش از طریق اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۹۳ نانومتر صورت گرفت (۱۷). یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول اوریک اسید مصرف نموده و به آلانتوئین تبدیل نماید.

یافته‌ها

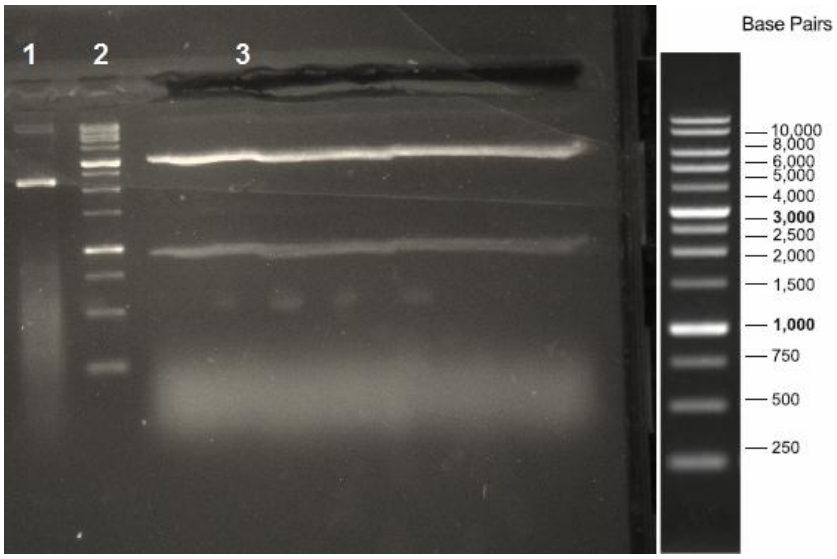
جداسازی ژن سنتتیک اوریکاز از پلاسمید pGEM-B1-AFUOX: بعد از دریافت و تکثیر پلاسمید حاوی ژن سنتتیک اوریکاز در وکتور کلونینگ pGEM-B1، آن توسط دو آنزیم *Nco*I و *Xho*I بریده شد و ژن اوریکاز از روی ژل آگاروز ۱ درصد جداسازی شد (شکل ۱). همان گونه که در چاهک شماره ۳ شکل ۱ مشخص شده است پلاسمید هضم شده با آنزیم‌های مربوطه دو باند نزدیک ۳۰۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد که به‌ترتیب مربوط به پلاسمید خطی pGEM-B1 و ژن سنتتیک ۹۲۹ نوکلئوتیدی می‌باشند.

ساخت سازواره نوترکیب *pET-28a(+)-AFUOX* و بررسی آن به روش هضم آنزیمی: به‌منظور ساخت سازواره نوترکیب ژن سنتتیک اوریکاز و *pET-28a(+)* استخراج شده از ژل، واکنش لیگاسیون توسط آنزیم T4-DNA لیگاز انجام شد و محصول آن به باکتری *اشریشیاکلی* سویه DH5α منتقل شد. تعداد ۳ کلونی از کلونی‌های رشد یافته انتخاب و استخراج پلاسمید شده و توسط آنزیم *Nco*I هضم گردید تا پلاسمید دارای ژن به فرم خطی تبدیل شود. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود چاهک‌های ۳، ۴، و ۵ پلاسمیدهای ساخته شده را نشان می‌دهد که اندازه‌ی آن‌ها بعد از ورود ژن ۹۲۹ نوکلئوتیدی نسبت به پلاسمید خطی *pET-28a(+)* (چاهک شماره‌ی ۱) به ۶۱۶۰ جفت باز افزایش یافته است

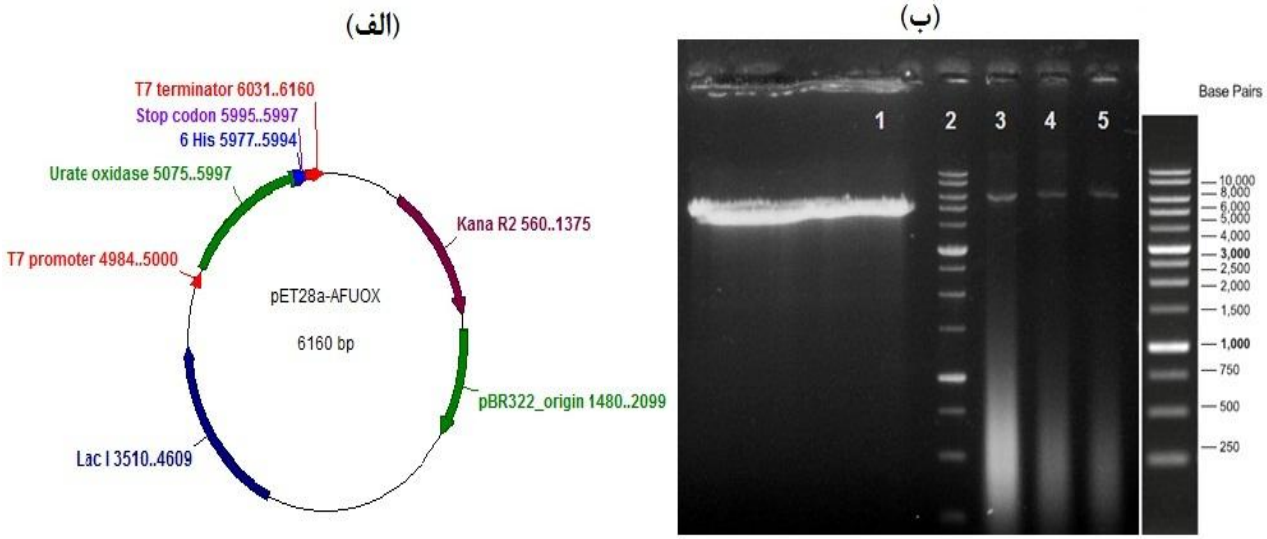
www.SID.ir

Archive of SID

(چاهک‌های ۳ تا ۵). چاهک شماره‌ی ۱ فرم خطی پلاسمید *pET-28a(+)* که برابر با ۵۳۶۹ جفت باز است را نشان می‌دهد.



شکل ۱: بررسی وجود ژن اوریکاز در پلاسمید pGEM-B1. چاهک ۱ پلاسمید استخراج شده، چاهک ۲ اندازه نمای ۱kb DNA، و چاهک بزرگ ۳ پلاسمید استخراج شده‌ای که با دو آنزیم NcoI و XhoI هضم شده است را نشان می‌دهد. دو باند پر رنگ در چاهک ۲ به ترتیب از بالا به پایین ۳۰۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. اندازه مولکولی اندازه نمای DNA استفاده شده در سمت راست ژل آورده شده است.

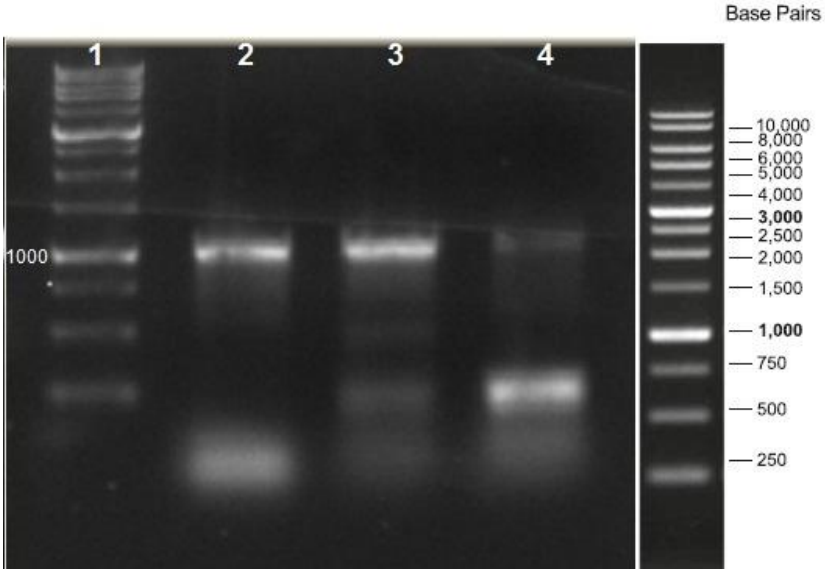


شکل ۲: نقشه و هضم آنزیمی سازواره pET-28a(+)-AFUOX. شکل الف موقعیت و مکان ژن اوریکاز را در پلاسمید بیانی pET-28a(+) در بین دو آنزیم محدود کننده NcoI و XhoI نشان می‌دهد. در شکل ب، چاهک بزرگ ۱، pET-28a(+) بریده شده با دو آنزیم NcoI و XhoI ، چاهک ۲ اندازه نمای 1Kb DNA، و چاهک‌های ۳ تا ۵، پلاسمید ساخته شده خطی که با آنزیم NcoI هضم شده است را نشان می‌دهد. اندازه مولکولی نردبان استفاده شده در سمت راست ژل آورده شده است. نقشه پلاسمید با نرم‌افزار ApE 2.0.47 A Plasmid Editor ترسیم شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

تایید ساخت سازواره نوترکیب pET-28a(+)-AFUOX به روش PCR: علاوه بر هضم آنزیمی به‌منظور حصول اطمینان بیشتر قبل از ارسال نمونه‌ها به تعیین توالی، از روی پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی که طراحی آن‌ها در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، PCR گذاشته شد تا در صورت مثبت بودن آن، نمونه‌ها جهت تعیین توالی ارسال شوند. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در هر سه کلونی انتخاب شده، قطعه مورد نظر تکثیر شده است و اندازه مولکولی آن‌ها نزدیک باند ۱۰۰۰ جفت بازی (۱۰۳۰) هستند (شکل ۳) این امر تایید می‌کند که قطعه‌ی مورد نظر در پلاسمید نوترکیب حضور دارد. علاوه بر باند ۱۰۳۰ جفت بازی در قسمت پایین ژل باندهایی مشاهده می‌شوند که مربوط به دایمر پرایمرها و یا باندهایی هستند که به‌طور غیر اختصاصی تکثیر شده‌اند. کلونی‌های ۱ و ۲ (چاهک‌های ۲ و ۳) انتخاب و برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره جنوبی) ارسال شدند. نتایج تعیین توالی حاکی از صحت کلونینگ در جایگاه مورد نظر یعنی در بین دو آنزیم *Nco*I و *Xho*I بود.



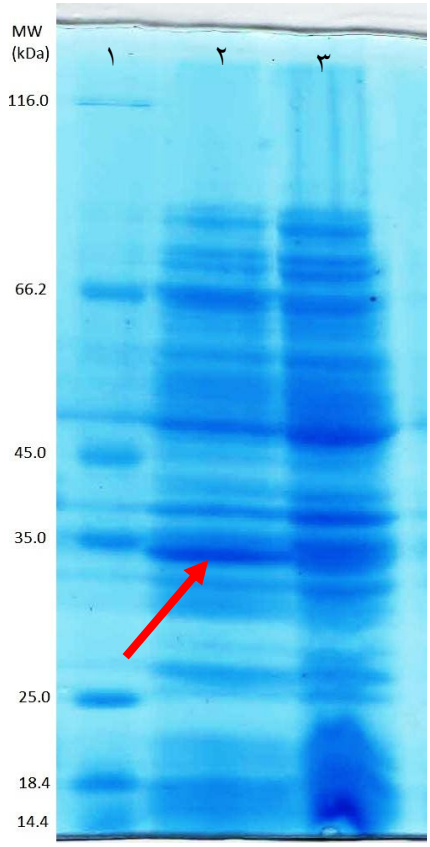
شکل ۳: بررسی صحت کلونینگ ژن اوریکاز توسط واکنش PCR. چاهک ۱، نردبان DNA، چاهک‌های ۲ تا ۴ محصول PCR شده از سازواره ساخته شده را نشان می‌دهند. محصول PCRتکثیر یافته بین دو پرایمر طراحی شده ۱۰۳۰ جفت باز می‌باشد. باندهای مشاهده شده در پایین ژل مربوط به دایمر پرایمرها و یا باندهایی هستند که به‌طور غیر اختصاصی تکثیر شده‌اند.

بررسی بیان و فعالیت آنزیم اوریکاز نوترکیب در *اشریشیاکلی*: پس از حصول اطمینان از ورود صحیح ژن اوریکاز به ناحیه مورد نظر در پلاسمید *pET-28a(+)*، سازواره به باکتری بیانی *اشریشیاکلی B21 (DE3)* منتقل شد. پس از بررسی شرایط متفاوت جهت القای بهینه پروتئین نوترکیب در باکتری بیانی، شرایط بهینه بیان آنزیم، دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۶ ساعت با غلظت القاگر (IPTG) ۱ میلی‌مولار به دست آمد. همان طوری که در شکل ۴ مشاهده می‌شود پروتئین نوترکیب با جرم مولکولی ۳۴/۵ کیلودالتون (جرم هر مونومر) بیان شده است. نتیجه‌ی تعیین فعالیت آنزیمی نشان داد که در محیط حاوی عصاره‌ی سلولی نمونه‌ی القا شده مقدار جذب نوری در مدت ۵ دقیقه به اندازه ۰/۲۵ واحد کاهش نشان داد اما در

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ی القا نشده کاهش جذبی رخ نداد. بنابراین فقط نمونه القا شده دارای فعالیت اوریکازی بوده و آنزیم در سیتوپلاسم *اشریشیاکلی* به‌صورت محلول بیان شده است و از نظر فعالیت آنزیمی فعال است.



شکل ۴: ژل SDS-PAGE بیان آنزیم در اشریشیاکلی. ۱) اندازه نمای پروتئینی، ۲) نمونه‌ی القا شده که آنزیم بیان شده با فلش قرمز نشان داده شده است، و ۳) نمونه ی القا نشده که الگوی پروتئین‌های باکتری را نشان می‌دهد.

بحث

سیستم‌های بیان باکتریایی برای تولید پروتئین‌های هترولوگوس بسیار جذاب هستند. زیرا آن‌ها توانایی رشد سریع و تراکم بالا در بسترهای ارزان قیمت را دارند (۲۰و۱۹). به‌طور کلی پروتئین‌های بیان‌شده در سیتوپلاسم یا فضای پری‌پلاسمیک تجمع می‌یابند. سیتوپلاسم انتخاب اول برای تولید و بیان پروتئین است. چون عملکرد بالایی را موجب می‌شود (۲۱). در این تحقیق ژن کد کننده‌ی سنتتیک آنزیم اورات اکسیداز *آسپرژیلوس* با موفقیت در وکتور *pET-28a(+)* کلون شد و توالی و قرارگیری آن در موقعیت قالب خواندن صحیح توسط تعیین توالی تایید شد. به علاوه ژن کلون شده تحت راه‌انداز T7 به صورت داخل سلولی با موفقیت توسط القاکننده در *اشریشیاکلی* بیان شد.

به‌منظور کاهش مقادیر اسید اوریک خون در بیماران نقرسی، رویکردهای درمانی به دو گروه تقسیم می‌شوند. در یک رویکرد هدف کاهش سنتز اوریک اسید در بدن بیمار است که

www.SID.ir

Archive of SID

با تجویز داروی آلوپورینول که مهار کننده‌ی آنزیم گزانتین اکسیداز است محقق می‌شود. در رویکرد دیگر هدف افزایش دفع اوریک اسید از کلیه‌ها است که توسط داروی پروبنیسید تسهیل می‌شود. هدف اصلی رویکردهای درمانی مختلف کاهش سطح اوریک اسید خون به میزان کمتر از ٦ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است. با این کار تعداد حمله‌های نقرس و همچنین اندازه‌ی توفی‌ها (Tophi) (رسوبات کریستال‌های اوریک اسید در بافت‌های نرم) کاهش می‌یابد (٢٤-٢٢). فبوکسوستات، یکی دیگر از مهارکننده‌های انتخابی آنزیم گزانتین اکسیداز است که به‌عنوان جایگزینی برای آلوپورینول مطرح شده است. برای مقایسه ی اثرات این دارو با آلوپورینول می‌توان مقالات متعددی را یافت که در تعدادی از آن‌ها به روشنی می‌توان موثرتر بودن این دارو را مشاهده کرد (۲۳). داروهایی که تاکنون مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند در گروه‌هایی از بیماران موثر نیستند و فرد بیمار پس از مدتی که تحت تیمار با این داروها قرار گرفته است، علایم ناموفق بودن این داروهای شیمیایی را بروز می‌دهد. امروزه آنزیم درمانی که یکی از شیوه‌های نوین درمان بسیاری از بیماری‌های متابولیک می‌باشد، در مورد بیماری نقرس نیز کاربرد پیدا کرده است (۲۵).

تا به حال آنزیم اورات اکسیداز گونه‌های مختلف میکروبی کلون‌سازی شده است که از بین آن‌ها می‌توان به اورات اکسیداز *باسیلوس سوبتیلیس* (۱۷)، و *سودوموناس آئروژینوزا* (٢٦) اشاره کرد. اما از بین آن‌ها آنزیم *آسپرژیلوس فلاوس* داری فعالیت و پایداری بهینه در درمان پیشنهاد شده است. آنزیم اورات اکسیداز *آسپرژیلوس فلاوس* دارای ۳۰۱ اسیدآمینه و جرم مولکولی ٣٤/٥ کیلودالتون می‌باشد که در پراکسیزوم سلول بیان می‌شود (۲۸و۲۷). مطالعات زیادی بر روی این آنزیم نوترکیب (راسبوریکاز) انجام شده است. علاوه بر این که آنزیم اورات اکسیداز برای درمان نقرس کاربرد دارد در درمان سندرم لیز توموری که پس از درمان لوسمی‌ها رخ می‌دهد نیز استفاده می‌شود. پس از تنها چهار ساعت پس از تزریق آنزیم به بیماران سطح اسید اوریک به میزان قابل توجهی پایین آمده و در طی چند روز پس از آن، آلانتوئین از ادرار بیمار دفع گردیده است (۳۰و ۲۹و ۸).

برای مطالعه‌ی عملکرد آنزیم اوریکاز *آسپرژیلوس فلاوس* در محیط‌های مختلف و در حضور مواد مختلف مانند نگهدارنده‌های دارویی، ابتدا لازم است که این آنزیم به صورت انبوه تولید و خالص‌سازی شود که برای تحقق این امر استفاده از تکنیک کلونینگ و القای بیان ژن ضروری می‌باشد. از طرف دیگر از آن جایی که سیستم کلونینگ و بیان *pET* یک سیستم قدرتمندی برای کلون‌سازی و بیان بیشتر پروتئین نوترکیب در *اشریشیاکلی* می‌باشد و آنزیم اوریکاز فاقد تغییرات پس از ترجمه می‌باشد می‌توان به‌منظور مطالعات آزمایشگاهی آن را در باکتری تولید کرد. نتایج پژوهش حاضر سازواره‌ای را ارایه می‌کند که در باکتری *اشریشیاکلی* با موفقیت بیان و تولید می‌شود. همچنین بررسی فعالیت آن در عصاره‌ی پروتئینی باکتری نشان می‌دهد که آنزیم نه تنها به صورت محلول بیان می‌شود بلکه دارای فعالیت کاتالیتیکی نیز می‌باشد.

پژوهش‌های متعددی بر روی کلونینگ و بیان طبیعی و نوترکیب آنزیم اوریکاز انجام شده است. در یکی از این تحقیقات که توسط گروه دکتر خلج در مرکز تحقیقات پاستور انجام شده است ژن آنزیم به‌صورت نوترکیب و ترشحی در مخمر پیشیا پاستوریس بیان و مطالعه شده است. فعالیت ویژه‌ی آنزیم خالص در آن پژوهش ۱۱/٦ واحد بر میلی‌گرم برآورد شده است که در مقایسه با میزان فعالیت ویژه‌ی آنزیم تجاری یعنی ۱۸/۲ واحد بر میلی‌گرم نسبتا کمتر است (۲۷). در تحقیق دیگری آنزیم به‌صورت نوترکیب در وکتور *pET-32a* کلون و در *اشرشیاکلی* بیان شده است و توسط روش‌های کروماتوگرافی تخلیص شده است. بررسی فعالیت آنزیمی نشان داده است که فعالیت آنزیم اوریکاز دارای

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت مشابه با فعالیت آنزیم راسبوریکاز تجاری می‌باشد (۲۸). علیرغم موفقیت‌های چشمگیر در بیان و فعالیت آنزیم مذکور در تمامی تحقیقات فوق آنزیم توسط روش‌های کروماتوگرافی چند مرحله‌ای تخلیص می‌شود. در پژوهش حاضر آنزیم در وکتور *pET-28a(+)* و در بالا دست توالی برچسب هیستیدین کلون و در *اشریشیاکلی* بیان شده است که تخلیص آنزیم نوترکیب را ساده و تک مرحله‌ای می‌کند. نتایج و بررسی‌های کلونینگ نشان داده است که ژن کد کننده آنزیم اوریکاز به درستی در محل مورد نظر قرار گرفته است. بررسی بیان آنزیم نوترکیب توسط ژل الکتروفورز پروتئین نشان داد که جرم مولکولی آنزیم حدود ۳۵ کیلودالتون است که حاکی از رونویسی و ترجمه‌ی کامل توالی ژنی کلون شده می‌باشد. بررسی فعالیت آنزیم اوریکاز در لیزات سلولی باکتری نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم تولید شده واحد بر میلی‌گرم ۷/٦۹ در پروتئین تام باکتری می‌باشد. یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول اوریک اسید مصرف نموده و به آلانتوئین تبدیل نماید. میزان فعالیت به دست آمده معیار معتبری از فعال بودن آنزیم بیان شده می‌باشد. از آن جایی که با افزایش خلوص آنزیم در طی فرایند تخلیص میزان فعالیت ویژه افزایش می‌یابد انتظار می‌رود که بعد از تخلیص، فعالیت آنزیم تولید شده از مقدار ۷/٦۹ واحد بر میلی‌گرم به مقدار فعالیت آنزیم تجاری یعنی ۱۸/۲ واحد بر میلی‌گرم نزدیک شود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ژن کدکننده‌ی سنتتیک آنزیم اوریکاز به آسانی آن را در سیستم بیانی *pET* کلون و در باکتری *اشریشیاکلی* بیان می‌شود. بررسی فعالیت ویژه‌ی آنزیم نشان داد که پروتئین آنزیمی به‌صورت فعال و محلول در سیتوزول *اشریشیاکلی* تولید شده است. کلون‌سازی و بیان ساده‌ی آنزیم اوریکاز در سیستم بیانی *pET* به محققان اجازه می‌دهد تا آنزیم اوریکاز را به مقدار زیادی بیان کند. علاوه بر این، از آن جایی که در ایران تاکنون هیچ اقدامی در زمینه‌ی آنزیم درمانی مخصوصا درمان نقرس با استفاده از آنزیم نوترکیب به جای استفاده از داروهای شیمیایی رایج صورت نگرفته است، کلون‌سازی و بیان آنزیم اوریکاز نوترکیب توسط روش‌های ساده می‌تواند به‌عنوان نقطه‌ی شروعی برای روش درمانی جدید برای بیماران نقرس و سندرم لیز توموری بسیار مفید باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مساعدت جناب آقای مهندس علی پیرنژاد کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال قدردانی را دارند.

References

1- Schumacher HR, Chen LX. Newer therapeutic approaches: gout. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006; 32: 235-44.

2- Pascual E, Pedraz T. Gout. *Curr Opin Rheumatol*. 2004; 16: 282-6.

3- Grassi W, De Angelis R. Clinical features of gout. *Reumatismo*. 2011; 63: 238-45.

4- Metzler DE. Biochemistry: The Chemical reactions of living cells: *Academic Press*; 2003.

5- Lee Y, Lee DH, Kho CW, et al. Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of-٥ hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. *FEBS letters*. 2005; 579: 4769-74.

www.SID.ir

Archive of SID

6- Fraisse L, Bonnet MC, de Farcy JP, Agut C, Dersigny D, Bayol A. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. *Analytical Biochem*. 2002; 309: 173-9.

7- Vogt B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout. *Nephrol Dialysis Transplant*. 2005; 20: 431-3.

8- Pui C-H, Mahmoud HH, Wiley JM, et al. Recombinant urate oxidase for the prophylaxis or treatment of hyperuricemia in patients with leukemia or lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 697-704.

9- Ueng S. Rasburicase (Elitek): a novel agent for tumor lysis syndrome. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2005; 18: 275-79.

10- Gabison L, Colloc'h N, Prange T. Azide inhibition of urate oxidase. *Acta Crystallor F Struct Biol Commun.* 2014; 70: 896-902.

11- Bui S, von Stetten D, Jambrina PG, et al. Direct evidence for a peroxide intermediate and a reactive enzyme–substrate–dioxygen configuration in a cofactor-free oxidase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014; 53: 13710-4.

12- Gabison L, Chiadmi M, El Hajji M, Castro B, Colloc'h N, Prangé T. Near-atomic resolution structures of urate oxidase complexed with its substrate and analogues: the protonation state of the ligand. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2010; 66: 714-24.

13- Retailleau P, Colloc'h N, Vivares D, et al. Urate oxidase from *Aspergillus flavus:* new crystal-packing contacts in relation to the content of the active site. *Acta Crystallographica Section D :Biological Crystallography*. 2005; 61: 218-29.

14- Legoux R, Delpech B, Dumont X, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J Biol Chem.* 1992; 267: 8565-70.

15- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Third ed.* Cold Spring Harbor.

16- Khazeh N, Pazhang M, Mehrnejad F, Chaparzadeh N. Cloning and production of recombinant human granzyme M enzyme. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2015; 23: 53-64.

17- Pfrimer P, Moraes LMPd, Galdino AS, et al. Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *J BioMed* Biotechunol. 2010; 2010: 674908.

18- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*. 1976; 72: 248-54.

19- Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Apply Microb Biotechnol*. 2004; 65: 363-72.

20- Mousavi S, Nazarian S, Amani J, Sorouri Zanjani R. Cloning, expression and purification of SNAP-25 proterin. J *Zanjan Univ Med Sci*. 2007; 15: 1-10.

21- Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol*. 2005; 16: 538-45.

www.SID.ir

Archive of SID

22- Perez-Ruiz F, Calabozo M, Pijoan JI, Herrero-Beites AM, Ruibal A. Effect of urate-lowering therapy on the velocity of size reduction of tophi in chronic gout. *Arthritis Care & Research*. 2002; 47: 356-60.

23- Becker MA, Schumacher Jr HR, Wortmann RL, et al. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *N E J Med*. 2005; 353: 2450-61.

24- Shoji A, Yamanaka H, Kamatani N. A retrospective study of the relationship between serum urate level and recurrent attacks of gouty arthritis: evidence for reduction of recurrent gouty arthritis with antihyperuricemic therapy. *Arthritis Care Res*. 2004; 51: 321-5.

25- Sundy JS, Hershfield MS. Uricase and other novel agents for the management of patients with treatment-failure gout. *Curr Rheumatol Reports*. 2007; 9: 258-64.

26- Shaaban M, Abdelmegeed E, Ali Y. Cloning, expression and purification of recombinant uricase enzyme from Pseudomonas aeruginosa Ps43 using Escherichia coli. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 25: 887-92.

27- Fazel R, Zarei N, Ghaemi N, et al. Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in Pichia pastoris. *Springer Plus*. 2014; 3: 395-402.

28- Li J, Chen Z, Hou L, et al. High-level expression, purification, and characterization of non-tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2006; 49: 55-9.

29- Pui C, 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: 1505-9.

30- Digumarti R, Sinha S, Nirni S, Patil S, Pedapenki R. Efficacy of rasburicase (recombinant urate oxidase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia: An Indian experience. *Indian J Cancer*. 2014; 51: 180-83.

www.SID.ir

Archive of SID

Cloning and Expression of Therapeutic Enzyme, *Aspergillus Flavus* Uricase in *E. coli*

Imani[1] M, Pazhang M[2], Mirzaeinia S[2]

[1]Dept. of Biochemistry, Basic Sciences Group, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

[2]Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Imani M, Dept. of Biochemistry, Basic Science Group, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: m.imani@urmia.ac.ir

Received: 29 Sep 2015 **Accepted:** 28 Dec 2015

Background and Objective: Uricase (EC 1.7.3.3) is an enzyme which catalyses uric acid to H_2O_2 and alantoin and is utilized in the treatment of hyperuricemia or gout. The aim of this study was cloning of *Aspergillus flavus* uricase synthetic gene into pET-28(a) and its recombinant expression in *E. coli*

Materials and Methods: The coding sequence of uricase retrieved from gene bank and once optimized, the gene synthesis was ordered. Then, the synthetic gene subcloned between *NcoI* and *XhoI* within the vector. The proper subcloning was confirmed by enzymatic digestion check, PCR and finally DNA sequencing. The construct, then chemically transformed into *E. coli* BL21 and induced by IPTG which followed by overexpression optimization. For enzyme expression evaluation, protein gel electrophoresis was utilized.

Results: Restriction check, PCR and sequencing indicated that the coding sequence of enzyme was cloned in the desired point of vector. The optimized condition obtained for enzyme expression was IPTG 1mM for 6 h at 22 °C. Enzyme molecular weight was determined 34.5 kDa by electrophoresis. Evaluation of uricase specific activity showed that the expressed enzyme is 7.69 U/mg and it is catalytically active.

Conclusion: The results of the current research showed that the uricase gene could be simply cloned and expressed in *pET* system. Enzyme specific activity determination exhibited that the enzyme was produced as a soluble protein and catalytically active in *E. coli* cytosole.

Keywords: Gout, Synthetic uricase, Aspergillus flavus, Recombination, Escherichia coli

www.SID.ir