

18th National and 3rd International Conference of Iranian Biophysical chemistry هجدهمین همایش ملی و سومین همایش بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

Enhancement of Thermostability of *Aspergillus flavus* Urate Oxidase by Site-Directed Mutagenesis

Asal banoo famili, bahareh dabirmanesh, khosro khajeh, azadeh ebrahim habibi*

1. phd student bichemistry, department of medical science and technology, science and research branch, islamic azad university, tehran, iran. Famili2016@gmail.com
2. Advisor Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, dabirmanesh@modares.ac.ir
3. Supervisor Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, khajeh@modares.ac.ir
4. Professor, Tehran University of Medical Sciences. aehabibi@sina.tums.ac.ir

Abstract

Uricase (EC 1.7.3.3; Uox) is a peroxisomal oxidoreductase that catalyzes the oxidation of uric acid to hydrogen peroxide and allantoin. Its absence in humans leads to elevated uric acid levels (hyperuricemia) due to the consumption of high-protein foods, ultimately resulting in diseases such as gout. Therefore, uricase is utilized as a therapeutic enzyme for treating hyperuricemia-related conditions. This study aims to enhance the thermal stability of uricase through targeted mutagenesis via genetic engineering. Initially, molecular dynamics simulations (insilico) were performed to analyze protein unfolding. By comparing parameters such as energy, radius of gyration, RMSD, and RMSF between candidate mutations and the wild-type enzyme, an optimal mutation was selected. Mutagenesis was conducted using targeted mutagenesis techniques, followed by optimization of enzyme transformation and expression in *E. coli*, with purification achieved through nickel affinity chromatography. The expression and purity of the enzyme were confirmed using SDS-PAGE, showing a molecular weight of 43 kDa for uricase in vertical electrophoresis. This study will evaluate the activity of both the mutated and wild-type enzymes and comparing their thermal stability.

Key words: (Root-Mean-Square-Deviation) RMSD, (Root-Mean-Square-Fluctuation) RMSF, radius of gyration, molecular dynamics simulations

18th National and 3rd International Conference of Iranian Biophysical chemistry هجدهمین همایش ملی و سومین همایش بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

افزایش پایداری حرارتی آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از جهش زایی هدفمند

عسل بانو فامیلی، بهاره دبیرمنش، خسرو خواجه، آزاده ابراهیم حبیبی *

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات famili2016@gmail.com

۲- دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس، dabirmanesh@modares.ac.ir

۳- استاد گروه بیوشیمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس khajeh@modares.ac.ir

۴- استاد گروه مدل سازی مولکولی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران aehabibi@sina.tums.ac.ir

چکیده

اوریکاز (EC 1.7.3.3; Uox) اکسیدوردوکتاز پروکسیزومی است که باعث اکسیداسیون اسید اوریک به H_2O_2 و آلانتوئین می شود. عدم وجود آن در انسان، سبب افزایش سطح اسیداوریک (هایپراوریسمی) با مصرف غذاهای پر پروتئین و نهایتاً ایجاد بیماریهایی نظیر نقرس می شود. بنابراین از اوریکاز به عنوان آنزیمی دارویی جهت درمان بیماریهای مرتبط با هایپراوریسمی در انسان استفاده می شود. هدف از این مطالعه پایداری حرارتی آنزیم اوریکاز به روش مهندسی ژنتیک با ایجاد جهش زایی هدفمند در آن است. ابتدا برای انتخاب جهشی مناسب، شبیه سازی دینامیک مولکولی (روش *insilico*) به منظور بررسی بازشدگی پروتئین انجام شد. با مقایسه نتایج پارامترهایی نظیر انرژی، شعاع ژیراسیون، RMSD، RMSF بین جهش های کاندید و تایپ وحشی آنزیم، جهش مطلوب انتخاب شد. ایجاد جهش با استفاده از جهش زایی هدفمند صورت گرفت. سپس ترانسفورم و بیان آنزیم در باکتری *E.coli* بهینه سازی و تخلیص آن با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل سفارز صورت گرفت. جهت تایید بیان و خلوص آنزیم از SDS-PAGE، با جرم مولکولی ۳۴ کیلو دالتون برای آنزیم اوریکاز در الکتروفورز عمودی، استفاده شد. در این مطالعه به فعالیت آنزیم جهش یافته و وحشی و مقایسه این دو واریانت در ارزیابی پایداری حرارتی آنزیم پرداخته خواهد شد.

واژه های کلیدی: شبیه سازی دینامیک مولکولی، شعاع ژیراسیون، جهش زایی هدفمند، الکتروفورز عمودی، RMSF، RMSD