مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره دوم (پیاپی ۷)، تابستان ۱۳۸۹
صفحات ۹۳ - ۸۷

Original Article

کلون سازی و بیان سیتوپلاسمی L- آسپاراژیناز II در باکتری اشریشیا کلی

حسین مهبودی[۱]، منصور عباچی[۲]، شهرام عراقی[۲]، دکتر هاله حامدی‌فر[۳]، دکتر بهروز وزیری[۴]، دکتر فریدون مهبودی*[۵]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، [۲]کارشناس ارشد، بخش تحقیق و توسعه، شرکت تحقیقاتی تولیدی سیناژن، [۳]استادیار، بخش تحقیق و توسعه، شرکت تحقیقاتی تولیدی سیناژن، [۴]استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پروتئین نوترکیب، انستیتو پاستور ایران، [۵]دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پروتئین نوترکیب، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: ال- آسپاراژیناز (تیپ II) با فعالیت ضدتوموری به طور طبیعی توسط باکتری اشریشیاکلی تولید می گردد. این آنزیم با تبدیل ال- آسپاراژین موجود در خون به آمونیوم و آسپارتیک اسید، در درمان لوکمیای لمفوبلاستیک حاد (ALL) مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این پژوهش، تولید سیتوپلاسمی آنزیم ال- آسپاراژیناز II و کلون سازی ژن آن بدون سیگنال پپتید و حذف متیونین ابتدایی بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا ژن ال- آسپاراژیناز II با روش PCR از اشریشیاکلی سویه K12 جداسازی و درون وکتور بیانی *pET32* مهندسی شده کلون گردید. توالی یابی و ارزیابی بیان ژن مورد نظر مطابق با روش‌های متداول به انجام رسیدند. سپس پلاسمید نوترکیب حاوی ژن متیونین آمینوپپتیداز خالص سازی گردید و با روش شوک حرارتی به درون باکتری تولید کننده آسپاراژیناز نوترکیب انتقال داده شد.

یافته ها: بیان ال- آسپاراژیناز سیتوپلاسمی بیش از نوع پری‌پلاسمی بود. همچنین با توجه به بیان بالای آنزیم متیونین آمینوپپتیداز در میزبان بیانی اشریشیاکلی Origami، مشخص شد که این آنزیم به طور مؤثری توانسته موجب حذف متیونین ابتدایی ال- آسپاراژیناز شود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای معرفی میزبان با قابلیت بیان بالای ال- آسپاراژیناز نوترکیب در سیتوپلاسم، می‌تواند گامی بزرگ در مسیر درمان لوکمی لنفوبلاستیک حاد و نیز افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب گردد.

واژگان کلیدی: ال- آسپاراژیناز II، اشریشیاکلی، کلون سازی، بیان ژن

دریافت مقاله: دی ۱۳۸۸ پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۸۹

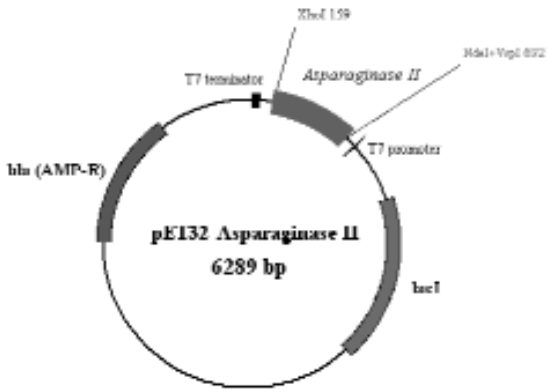
مقدمه

آنزیم ال- آسپاراژیناز یک آمیدوهیدرولاز است که با دآمیناسیون ال- آسپاراژین آن را به ال- آسپاراتات و آمونیوم تبدیل می‌نماید. سوبسترا و محصول این واکنش آنزیمی، هر دو نقش مهمی در فرآیندهای متابولیکی موجودات زنده، از باکتری‌ها تا پستانداران ایفا می‌نمایند (۱-۴). آنزیم آسپاراژیناز به‌وسیله میکروارگانیسم‌های مختلفی ساخته می‌شود (۵). دلیل فعالیت ضدتوموری آنزیم، تمایل زیاد به سوبسترای ال- آسپاراژین (k_m=$10^{-5}m$) و وابستگی سلول‌های توموری خاص به ذخیره ال- آسپاراژین خارج سلولی می‌باشد (۴ و ۶). با وجود استفاده گسترده از ال- آسپاراژیناز، اما اثرات جانبی زیادی نیز به دلیل استفاده از آن در درمان بیماران گزارش شده است. از آن جمله می‌توان به مسمومیت، تخریب کبد، دیابت، لوکوپنی، حمله قلبی یا مغزی، بی‌نظمی‌های انعقادی، ترومبوزیس درون جمجمه‌ای و هموراژی اشاره نمود (۷). بررسی‌ها نشان داده که آسپاراژیناز نوع دوم دارای خاصیت ضدتوموری بالاتری نسبت به نوع اول است. همچنین در مطالعات

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پروتئین نوترکیب
تلفن: ۴۱۱۸ ۱۳۷ ۰۹۱۲
پست الکترونیک: mahboudif@cinagen.com

کریستالوگرافی و آنالیز همولوژی توالی مشخص شده است که آسپاراژیناز تیپ II، دارای دو بنیان آمینو اسیدی حاوی ترئونین بسیار حفاظت شده می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده که این نواحی بیشتر در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته است (۵). امروزه به طور وسیعی از داروی آسپاراژیناز II نوترکیب برای درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد (ALL) استفاده می‌شود. در این بیماری سلول‌های لنفوسیتی سرطانی به دلیل نقص در ژن آسپاراژین سنتتاز توانایی تولید آسپاراژین مورد نیاز خود را به طور کامل ندارد و از این نظر وابسته به آسپاراژین موجود در خون می‌باشند. در صورت درمان با آسپاراژیناز، اسید آمینه آسپاراژین موجود در خون به اسیدآسپارتیک و یون‌های آمونیوم تجزیه می‌شود. بنابراین سلول‌های سرطانی به دلیل کمبود آسپاراژین مورد نیاز برای رشد و تکثیر دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) می‌گردند (۸). همچنین ال ـ آسپاراژیناز نوترکیب علاوه بر شکستن آسپارژین با جلوگیری از مراحل G0/G1 موجب کاهش سنتز و همانندسازی DNA در سلول‌های توموری می‌شود (۸).

به دلیل فعالیت ضد توموری ال ـ آسپاراژینازها، تلاش شده است تا نیمه عمر این ماده در خون افزایش یابد. برخی از این تلاش‌ها شامل به دام انداختن آنزیم در لیپوزوم‌ها یا میکروکپسول‌ها (از طریق پیوند کووالانسی به ماکرومولکول‌هایی مانند دکستران، آلبومین یا مونومتوکسی پلی اتیلن گلیکول) بوده است. اما متأسفانه هیچ یک از این روش‌ها نتوانسته است زیان‌های درمانی ال ـ آسپاراژیناز را از بین ببرند (۹ و ۱۰). به همین دلیل امروزه دانشمندان به دنبال شناسایی آنزیم‌های جدید با عمل کرد بهتر و نیز بررسی آنزیم‌های مشابه از باکتری‌های دیگر می‌باشند. مطالعه حاضر با هدف تولید سیتوپلاسمی آنزیم ال ـ آسپاراژیناز II و کلون سازی ژن آن بدون سیگنال پپتید و حذف متیونین ابتدایی انجام شد.



شکل ۱: ساختار حامل نوترکیب دارای ژن آسپاراژیناز.

مواد و روش‌ها

الف) تکثیر و جداسازی ژن ال ـ آسپاراژیناز *II*: در ابتدا اشریشیا کلی K12 سویه Origami در محیط LB broth کشت داده شد. سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت فرمنتاز (ساخت کشور لیتوانی) استخراج گردید. برای تکثیر ژن آسپاراژیناز II از تکنیک PCR و پرایمرهای F: 5'-GCGATTAATATGCAGATGAGTCTG-3' و R: 5'-ATACTCGAGTCACTGTGTGGCAACG-3' (شرکت سیناژن) استفاده گردید. پرایمر پیشرو دارای جایگاه برش برای آنزیم *VspI* و پرایمر پیرو دارای جایگاه برش برای آنزیم *XhoI* (نقاط علامت‌گذاری شده) بود. به منظور افزایش بیان ژن آسپاراژیناز II در سیتوپلاسم، پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که در واکنش PCR توالی مربوط به سیگنال پپتید پروتئین به همراه ژن آسپاراژیناز تکثیر نگردد (۱۱). آنالیز و طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene runner 3.05 صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۳۰ میکرولیتر PCR mix، ۲ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu* (شرکت سیناژن)، یک میکرولیتر از هر پرایمر و یک میکرولیتر از نمونه DNA الگو انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به‌وسیله نور UV مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

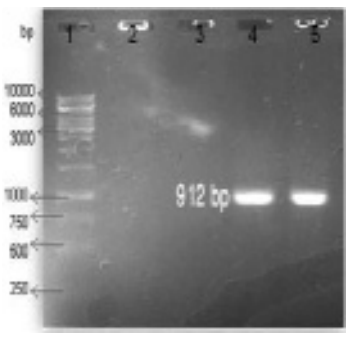
ب) تهیه پلاسمید نوترکیب: در ابتدا ژن استاندار دارویی (سکانس ارائه شده در سایت بانک دارویی) تکثیر شده به وسیله واکنش PCR با استفاده از آنزیم لیگاز *T4* باکتریایی در وکتور بیانی *pET-32-a*

مهندسی شده کلون گردید (شکل ۱). سپس محصول الحاق شده به کمک شوک حرارتی به درون باکتری مستعد شده اشریشیا کلی Top10 ترانسفورم شد. پلاسمیدهای حاصل از کلونی‌های نوترکیب، با استفاده از کیت فرمنتاز استخراج شدند. سپس با استفاده از تکنیک‌های هضم آنزیمی، PCR و مشاهده بر روی ژل آگاروز، کلون نوترکیب انتخاب گردید. برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید مربوط به کلنی تأیید شده استخراج و با روش توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از توالی یابی با سکانس استاندارد دارویی مقایسه گردید.

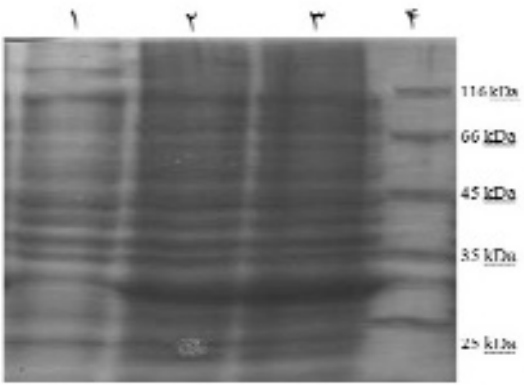
ج) بیان و بهینه‌سازی پروتئین نوترکیب: پلاسمید نوترکیب به باکتری‌های مستعد شده اشریشیا کلی Origami DE3 به عنوان میزبان بیانی منتقل شد. سپس برای القای تولید انبوه پروتئین نوترکیب از IPTG (ایزو پرو پیل بتا-دی- تایو گالاکتو پیرانوزید) استفاده گردید. در مرحله بعد برای آنالیز و مشاهده بیان پروتئین نوترکیب از روش SDS-PAGE لاملی استفاده شد. به منظور افزایش بیان و سنجش پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا، شرایط مؤثر در بیان آن مانند سویه‌های بیانی، مقدار IPTG، دما، زمان پس از القا و محیط کشت بهینه‌سازی گردیدند. برای بهینه‌سازی سویه‌های بیانی، سلول‌های Origami DE3، BL21 DE3 plysS، BL21 Codon plus و Rossetta DE3 plys به طور جداگانه بر روی محیط LB Broth کشت داده شدند. پس از رسیدن به OD=۰/۶ (چگالی نوری) مراحل مستعد کردن و ترانسفورمیشن انجام گرفتند. سپس میزان بیان در کلنی‌های نوترکیب هر سویه، از طریق SDS-PAGE بررسی و مقایسه گردید. همچنین برای ارزیابی میزان بیان در زمان‌های قبل و پس از القا ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت، دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های ۰/۵ مولار و ۱ مولار IPTG و محیط کشت‌های Luria Bertani (LB) و (TB) Traffic Broth از روش SDS-PAGE استفاده گردید.

د) انتقال پلاسمید دارای ژن متیونین آمینوپپتیداز به میزبان نوترکیب: در این مرحله میزبان تولید کننده آنزیم متیونین آمینوپپتیداز (MAP) نوترکیب از شرکت سیناژن خریداری گردید. قبل از انتقال حامل نوترکیب حاوی ژن *map*، بیان پروتئین نوترکیب در هر دو میزبان از طریق SDS-PAGE مشاهده شد. میزبان تولید کننده متیونین آمینوپپتیداز در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰µg/ml کشت داده شد. پس از استخراج پلاسمید حاوی ژن *map*، مراحل تراسفورماسیون بر روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کانامایسین به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰µg/ml و ۵۰µg/ml انجام گرفت. کلنی رشد کرده بر روی محیط آگار دار دوباره کشت داده شد. سپس با استفاده از روش SDS-PAGE بیان هم زمان دو پروتئین مشاهده گردید.

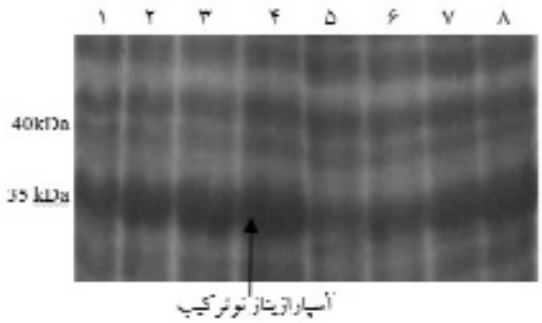
ه) آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات: پروتئین‌ها از روی ژل SDS-PAGE به کمک روش انتقال در تانک به غشای نیتروسلولزی انتقال یافتند. به منظور جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی پروتئین‌های نشان‌دار، مناطق آزاد غشا قبل از مرحله تشخیص به وسیله توئین ۲۰ مسدود شدند. در مرحله بعد غشا در ۱۰ میلی‌لیتر آنتی‌بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰۰) در محلول TBS حل گردید. غشا پس از شستشو با بافر تریس نمکی



شکل۲: محصول واکنش PCR. ستون ۱) مارکر 1Kb، ستون های ۲ و ۳) کنترل منفی، ستون های ۴ و ۵) ژن آسپاراژیناز تکثیر شده (۹۱۲bp).



شکل ۳: تشخیص تولید پروتئین با روش SDS-PAGE. ستون ۱) قبل از القا با IPTG، ستون های ۲ و ۳) چهار ساعت پس از القا با IPTG و ستون ۴) مارکر وزنی پروتئین.

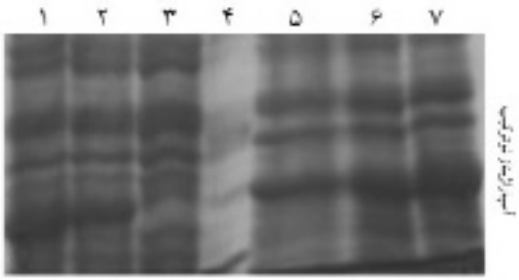


شکل ۴: بهینه سازی دما. ستون ۱) دو ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۲) چهار ساعت پس از القا در دمای۳۷°C، ستون ۳) شش ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۴) ۲۴ ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۵) دو ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۶) چهار ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۷) شش ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۸) ۲۴ ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C.

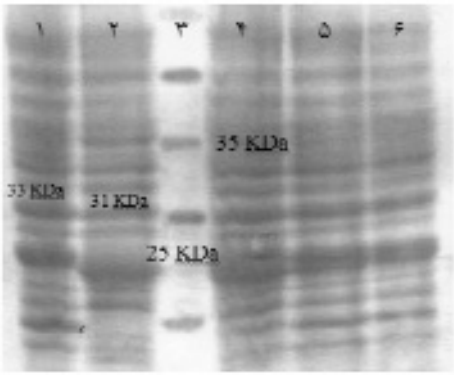
حاوی توین ۰/۰۵٪، درون آنتی‌بادی ثانویه کانجوگه شده با آنزیم پراکسیداز قرار داده شد. در نهایت غشا پس از شستشو با بافر تریس در معرض سوبسترای آنزیم پراکسیداز (شامل ۵ میلی گرم در میلی‌لیتر دی آمینوبنزیدین و پراکسیداز هیدروژن ۱ درصد در بافر تریس نمکی با ۵/۷pH قرار گرفت.

نتایج

نتایج PCR تکثیر قطعه ۹۱۲ جفت بازی (ژن آسپاراژیناز) را نشان داد (شکل ۲). نتایج حاصل از روش SDS-PAGE نشان داد که پروتئین نوترکیب به درستی پس از چهار و شش ساعت القا با IPTG در میزبان بیانی اشریشیا کلی Origami DE3 تولید

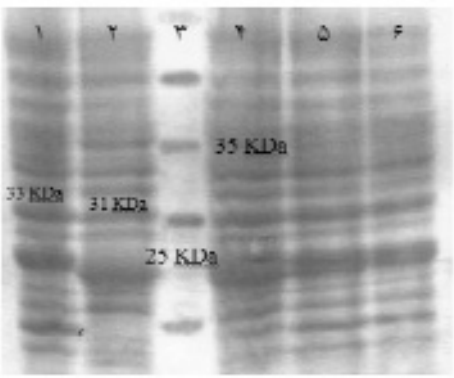


شکل ۶: بهینه سازی محیط کشت و زمان. ستون ۱) شش ساعت پس از القا در محیط LB، ستون ۲) چهار ساعت پس از القا در محیط LB، ستون ۳) قبل از القا در محیط LB، ستون ۴) مارکر، ستون ۵) دو ساعت پس از القا در محیط TB، ستون ۶) چهار ساعت پس از القا در محیط TB، ستون ۷) شش ساعت پس از القا در محیط TB.

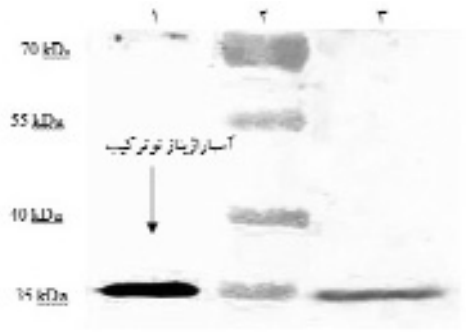


شکل ۵: بهینه سازی مقدار IPTG. ستون ۱) مارکر، ستون ۲) سویه Origami DE3 القا شده با ۱ میلی مولار IPTG، ستون ۳) سویه Origami DE3 القا شده با نیم میلی مولار IPTG، ستون ۴) سویه BL21 DE3 plysS القا شده با ۱ میلی مولار IPTG، ستون ۵) باکتری BL21 DE3 plysS القا شده با نیم میلی مولار IPTG.

می‌شود (شکل ۳). بیشترین میزان بیان پروتئین نوترکیب، به ترتیب در سویه‌های Origami DE3 و BL21 DE3 plysS مشاهده گردید. بنابراین از سویه های یاد شده برای بهینه سازی بیان در مراحل بعد استفاده شد. همچنین نتایج نشان داد که به منظور تولید بهینه پروتئین نوترکیب بهترین دما، غلظت IPTG، زمان و نوع محیط کشت به ترتیب دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (شکل ۴)، غلظت ۰/۵mM (شکل ۵)، ۴ ساعت القا و محیط ترافیک براث (شکل ۶) می‌باشد. به منظور حذف کامل متیونین (فرمیل متیونین) از ابتدای زنجیره پروتئین، پلاسمید میزبان تولید کننده آنزیم متیونین آمینوپپتیداز نوترکیب وارد میزبان تولید کننده آسپاراژیناز نوترکیب شد. در شکل ۷ بیان دو پروتئین متیونین آمینوپپتیداز (۳۳ کیلو



شکل ۷: الگوی ژل SDS-PAGE. ستون ۱) میزبان تولید کننده متیونین آمینوپپتیداز (۳۳KDa)، ستون ۲) میزبان تولید کننده آسپاراژیناز (۳۱KDa)، ستون ۳) مارکر وزنی پروتئین، ستون ۴) میزبان تولید کننده متیونین آمینوپپتیداز و ال ـ آسپاراژیناز، ستون ۵) میزبان تولید کننده متیونین آمینوپپتیداز و ال ـ آسپاراژیناز چهار ساعت پس از القا، ستون ۶) میزبان تولید کننده متیونین آمینوپپتیداز و ال ـ آسپاراژیناز شش ساعت پس از القا.



شکل ۸: تست وسترن بلات: ستون ۱) آسپاراژیناز نوترکیب در باکتری BL21 DE3 PlysS، ستون ۲) آسپاراژیناز نوترکیب در باکتری Origami DE3، ستون ۳) مارکر و ستون ۴) آسپاراژیناز استاندارد.

دالتون) و ال ـ آسپاراژیناز (۳۱ کیلو دالتون) با روش SDS-PAGE نشان داده شده است. در نهایت برای تایید نهایی آسپاراژیناز نوترکیب، تست وسترن بلات به انجام رسید (شکل ۸).

بحث

فرآیند تولید ال ـ آسپاراژیناز به وسیله ارگانیسم‌های مختلفی مانند قارچ‌ها (پنی‌سیلیوم، آسپرژیلوس و نکتریا)، باکتری‌ها (مایکوباکتریوم، اشریشیا کلی، سراشیا مارسسنس و اروینیا کاروتوورا)، مخمرها و سلول‌های حیوانی صورت می‌گیرد. اما آنزیم حاصل از همه آن‌ها فعالیت ضدتوموری ندارد (۸). امروزه مطالعات زیادی بر روی سویه های جدید تولید کننده این آنزیم در حال انجام است. به عنوان نمونه با استخراج ال ـ آسپارازیناز از اکتینومیست‌های دریایی مشخص گردید که اکتینومیست‌های دریایی نیز می‌توانند به عنوان یک عامل ضدسرطان پتانسیل تولید ال ـ آسپاراژیناز را داشته باشند (۱۲). به‌طور طبیعی در باکتری اشریشیا کلی دو نوع آسپاراژیناز تولید می‌شود. هر کدام از این آنزیم‌ها به وسیله ژن‌های مختلفی بیان می‌شوند و خاصیت فیزیکوشیمیایی شان نیز متفاوت است (۱۳ و ۱۴). آسپاراژیناز نوع اول یک پروتئین سیتوپلاسمی است و نوع دوم یک پروتئین پری‌پلاسمیک با فعالیت ضدتوموری می‌باشد (۱۵ و۱۶). pH بهینه برای فعالیت آسپاراژیناز نوع اول ۶/۸ و برای نوع دوم بین ۷/۵ تا ۸/۶ می‌باشد (۱۷ و۱۸). مایتا (Maita) و همکاران در سال ۱۹۷۴، توالی آمینواسیدی آسپاراژیناز را در باکتری‌های اروینیا کریزانتمی و اشریشیا کلی مقایسه و میزان تشابه این پروتئین را در آن‌ها ۴۶ درصد گزارش نمودند (۱۹). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از DNA نوترکیب به منظور انتقال DNA می‌تواند میزان تولید و فعالیت آنزیم را بهبود بخشد. کرنا (Corena) و همکاران در سال ۲۰۰۱، نشان دادند که کلنی‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب در مقایسه با سویه‌های عادی آسپاراژیناز بیشتری را تولید می‌نمایند (۲۰). خوشو (Khushoo) و همکاران در سال ۲۰۰۴، از توالی رهبر Pel B به منظور تولید آسپاراژیناز نوترکیب پری‌پلاسمی استفاده نمودند. محققین یاد شده با تکثیر ژن *ansB* کدکننده آسپاراژیناز II در اشریشیا کلی K12 با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، محل برش آنزیم‌های *BamHI* و *NdeI* را در دو طرف پرایمر وارد نمودند. همچنین کلون‌سازی ژن مورد نظر در وکتور بیانی *pET14b* حامل قطعه فیوژن HisTag 6x در پایانه آمینی انجام دادند (۱۶). اما برخلاف مطالعه یاد شده ما در این پژوهش از توالی آسپاراژیناز بدون توالی سیگنال پپتید طبیعی ژن و نیز وکتور بیانی *pE-T32* مهندسی شده (فاقد Tag Trx) استفاده نمودیم. در اکثر مطالعات انجام شده از سویه‌های معمولی و یا نوترکیب به منظور تولید آسپاراژیناز II در فضای پری‌پلاسمیک استفاده شده است. اما در مطالعه حاضر مراحل کلونینگ و طراحی پرایمر طوری انجام گرفت که پروتئین بدون توالی آمینواسیدی اضافی در سیتوپلاسم بیان گردد. از آن جایی که در این روش بیان پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتری اشریشیا کلی بالا می‌رود، احتمال حذف نشدن کامل متیونین ابتدایی در پروتئین نوترکیب وجود داشت. به همین دلیل برای حذف کامل متیونین ابتدایی از بیان هم زمان متیونین آمینوپپتیداز نوترکیب استفاده گردید.

نتیجه گیری

امروزه استفاده از ال ـ آسپاراژیناز در درمان مولکولی لوکمی، پیشرفت قابل ملاحظه ای داشته است. در حال حاضر این آنزیم از باکتری‌های اشریشیا کلی و اروینیا کریزانتمی جداسازی و به صورت تجاری به عنوان داروی ضدسرطان (لوکمی لنفوبلاستیک حاد و لنفومای غیرهوچکینی) عرضه می‌گردد. بنابراین نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای ایجاد میزبان با قابلیت بیان

بالای ال- آسپاراژیناز نوترکیب، می‌تواند گامی بزرگ در مسیر پیشرفت و افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب شود. همچنین یافته های ما نشان داد که به منظور ارزیابی اثرات بالینی و نیز به عنوان یک آنزیم ضدلوکمی می‌توان از آسپاراژیناز به عنوان یک گزینه مناسب در مطالعات بعدی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل بخش تحقیق و توسعه شرکت تحقیقاتی تولیدی سیناژن به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Kotzia GA, Labrou NE. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. J. Biothechnol. 2007; 127: 657-669.
2. Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. Do bacterial L-asparaginase utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu?. J. Biochem. Biophys. Acta. 2001; 1550: 117-128.
3. Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Er. chrysanthemi* L- asparaginase. J. Biochem. 2001; 40: 5655-5664.
4. Afrasiabi R, Aghaiypour K, Kafilzadeh F, Safaviyeh S. Cloning, sequence analysis, and expression of L-asparaginase obtained from *Erwinia chrysanthemi*. Jouenal of Microbial World. 2010; 3(1): 7-15.
5. Lubkowski J, Palm G, Gilliland Gary L, Derst CH, Rohm K, wlodawer A. Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase. J. Biochem. 1996; 241: 201-207.
6. Harms E, Wehner A, Aung HP? Rohm KH. A catalytic role for threonine-12 of *E.coli* asparaginaseII as established by site-directed mutagenesis. FEBS. 1991; 285: 55-58.
7. Ferrara MA, Severino NMB, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EMM, Siani AC, Pereira N, Torres FAG, Bon EPS. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cervisiae Asp3* gene. Enzyme Microb. Tech. 2006; 39: 1457-1463.
8. Youssef MM, Al-Omair MA. Cloning, purification, characterization and immobilization of l-asparaginase II from *E. coli* W3110. Asian J. Biochem. 2008; 3 (6): 337-350.
9. Ward KR, Adams GDJ, Alpar HO, Irwin WJ. Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilisation-a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant. J. Pharmaceutics. 1999; 187: 153-162.
10. Zhang YQ, Zhou WL, Shen WD, Chen YH, Zha XM, Shirai K, Kiguchi K. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L-asparaginase bioconjugates. J. Biotechnol. 2005; 120: 315-326.
11. Rusel D, Sambrook J. Molecular cloning A laboratory Manual. Third edition ?Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
12. Nakahama K, Imada A, Igarasi S, Tubaki K. Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species J Gen Microbiol. 1973; 75: 269-273.
13. Jennings MP, Beacham IR. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II ansB and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. J. Bacteriol. 1990; 172: 1491-1498.
14. Jeristrom PG, Liu J, Beacham IR. Regulation of *E. coli* l-asparaginase II and 1-aspartaseby the fnr gene product. FEMS Microbiol. Lett. 1989; 41: 127-130.
15. Roberts J, Bursonand G, Hill JM. New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1968; 95: 2117-2123.
16. Khushoo A, Pal Y, Singh BN, Mukherjee KJ. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. Protein Expression Purificat. 2004; 38: 29-36.
17. Avramis VI, Panosyan EH. Pharmacokinetic/pharmacodynamics relationships of asparaginase formulations: The past, the present and recommendations for the future. Clin. Pharmacokinet. 2005; 44: 367-393.
18. Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. Crit. Rev. Biotechnol. 2007; 27: 45-62.
19. Maita T, Morokuma K, Mastuda G. Amino acid sequence of L-asparaginase from *E. coli*. J. Biochem. 1974; 76: 1351-1354.
20. Corena CP, Lupescu I, Vatafu I, Caraiani T, Savoiu VG, Campeanu GH, Grebenisan I, Negulescu GHP, Constantinescu D. Production of L-asparaginase II by recombinant *Escherichia coli* cells. Roum. Biotechnol. Lett. 2002; 7(3): 717-772.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 2, June 2010

Cloning and Cytoplasmic Expression of L-Asparaginase II in *E. coli*

Hossein Mahboudi[1], Mansour Abachi[2], Shahram Araghi[2], Haleh Hamedifar[3], Behrouz Vaziri[4], Fereidoun Mahboudi[5]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[2]M.Sc., Department of Research and Development, CinnaGen Co., Tehran, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Research and Development, CinnaGen Co., Tehran, Iran
[4]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Protein Chemistry Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
[5]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Recombinant Protein Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract
Background and objectives: L-Asparaginase (isozyme II) is a natural product of *E. coli* that possesses an antitumor activity. This enzymeis used for treating acute lymphoblastic leukemia (ALL). The aim of this study was to clone of the corresponding gene without signal peptide and also without first methionine as well as to express the gene in cytoplasm.
Materials and Methods: The L-Asparaginase gene was isolated by PCR from *E. coli* K12 strain and cloned into engineered expression vector pET32. Sequencing and evaluation of gene expression were done by routine procedure. Methionine amino peptidase containing recombinant plasmid was purified and transferred into recombinant asparaginase producing bacterium by heat shock method.
Results: The majority of L-asparaginase was expressed in cytoplasm. Based on high expression of methionine amino peptidase enzyme in *E. coli* Origami, it was expected that the first methionine of L-asparaginase has been removed efficiently.
Conclusion: According to the achieved results, the recombinant bacterium with extensive ability to express cytoplasmic recombinant L-asparaginase is an ideal candidate for industrial production of L-asparaginase.
Keywords: L-Asparaginase II, *Escherichia coli*, Cloning, Gene expression

Correspondence to: Fereidoun Mahboudi
E-mail: mahboudif@cinnagen.com
Tel: +989121374118
Journal of Microbial World 2010 3(2): 87-93