مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره اول (پیاپی ۶)، بهار ۱۳۸۹
صفحات ۱۵ ـ ۷

Original Article

کلون سازی، تعیین توالی و بیان ژن آسپاراژیناز باکتری اروینیا کریزانتمی

راضیه افراسیابی*[۱]، دکتر خسروآقایی پور[۲]، دکتر فرشید کفیل زاده[۳]، صدیقه سادات صفویه[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، بخش ژنومیکس و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
[۳]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۴]کارشناس ارشد، بخش ژنومیکس و مهندسی ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم L ـ آسپاراژیناز داروی موثر در درمان لوکمی لنفوبلاستیک و لنفومای غیرهوچکینی است. مهم‌ترین باکتری‌های مولد این آنزیم باکتری‌های اشریشیا کلی و گونه‌های مختلف اروینیا به ویژه اروینیا کریزانتمی می‌باشند. هدف از این پژوهش، ارزیابی آنزیم L ـ آسپاراژیناز باکتری اروینیا کریزانتمی DSM 4610 بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا DNA ژنومی باکتری استخراج و پس از طراحی پرایمرهای اختصاصی Echr Asn F و Echr Asn R1 آزمون PCR انجام شد. در مرحله بعد، این ژن درون وکتور pTZ57R/T الحاق و به درون سلول میزبان اشریشیا کلی DH5α وارد شد و پلاسمیدهای نوترکیب استخراج گردیدند. پس از تعیین توالی، نتایج توسط نرم افزار DNAMAN مورد بررسی قرار گرفت. با طراحی پرایمرهای بیانی، همسانه سازی در ناقل pAED4 انجام شد و پس از تراریخت نمودن سلول‌های اشریشیا کلی BL21(DE3) بیان پروتئین با روش SDS-PAGE ارزیابی شد.

یافته‌ها: ژن جدا شده از سویه اروینیا کریزانتمی DSM4610 تفاوت‌های مشخصی با سایر ژن‌های مربوط به این آنزیم در بانک ژن داشت و با شماره دسترسی JF972567 در بانک ژن ثبت شد. بیشترین میزان بیان پروتئین پس از فرآیند بهینه سازی در شرایط غلظت نیم میلی‌مولار IPTG، محیط کشت LB Broth و دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد حاصل گردید. الکتروفورز پروتئین روی ژل SDS-PAGE، پروتئینی به وزن مولکولی تقریبا ۳۷/۵ کیلودالتون را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که آنزیم L ـ آسپاراژیناز باکتری اروینیا کریزانتمی، شرایط مناسب برای مطالعات بیشتر به عنوان یک آنزیم ضدلوکمی را دارد.

واژگان کلیدی: L ـ آسپاراژیناز، اروینیا کریزانتمی، *pAED4*، SDS-PAGE

دریافت مقاله: آذر ۱۳۸۸ پذیرش برای چاپ: بهمن ۱۳۸۸

مقدمه

آنزیم L ـ آسپاراژیناز یک آمیدوهیدرولاز می‌باشد که L ـ آسپاراژین را دآمینه کرده و به L ـ آسپاراتات و آمونیوم هیدرولیز می‌نماید (۳-۱). سوبسترا و محصولات این واکنش آنزیمی، در تعدادی از فرآیندهای متابولیک از باکتری‌ها و پستانداران، نقش‌های مهمی را ایفا می‌نمایند (۴-۱). یک نوع از این آنزیم به نام L ـ آسپاراژیناز باکتریایی تیپ

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۷۳۸۱۰۳۶۸
پست الکترونیک: razi114@yahoo.com

II، یک آنزیم پری پلاسمیک است که فعالیت ضدتوموری دارد. مطالعات کریستالوگرافی و آنالیز همولوژی توالی نشان می‌دهد که همه آسپاراژینازهای تیپ II شناخته شده، دارای دو بنیان آمینواسیدی ترئونینی بسیار حفظ شده می‌باشند. این آنزیم‌ها، هوموتترامری و دارای وزن ملکولی حدود ۱۶۰-۱۴۰ کیلو دالتون هستند. آنزیم دارای چهار جایگاه فعال می‌باشد. هر جایگاه فعال بین انتهای C و N دو منومر مجاور واقع شده است و بنیان‌های تشکیل دهنده آمینواسیدهای آن، حافظت شده می‌باشد (۱). این آمینواسیدها شامل تریادکاتالیتیک ترئونین (۱۲یا ۱۹ در توالی ECAII)، آسپارتیک اسید ۹۰ (Asp90) و لیزین ۱۶۲ (Lys162) می‌باشند (۵ و ۶).

امروزه این آنزیم از دو منبع باکتریایی اشریشیاکلی (*E. coli*) و اروینیاکریزانتمی (*Erwinia chrysanthemi*) جدا شده و به عنوان داروی تجاری ضدسرطان (لوکمی لنفوبلاستیک حاد و لنفومای غیرهوچکینی) عرضه می‌شود (۷ و ۸). فعالیت ضدتوموری آنزیم در نتیجه تمایل بالای آن برای سوبسترای L-آسپاراژین (k_m=10^{-5}m) و وابستگی سلول‌های توموری خاص به ذخیره L-آسپاراژین خارج سلولی می‌باشد. برخلاف سلول‌های طبیعی، سلول‌های توموری، L-آسپاراژین را به کندی سنتز می‌کنند. کاهش ذخیره L-آسپاراژین در حال گردش توسط L-آسپاراژیناز، موجب از بین رفتن سلول‌های توموری به دلیل ناتوانی در ساخت پروتئین می‌شود (۴ و ۷). تخریب کبد، دیابت، لوکوپنی، حمله قلبی یا مغزی و بی نظمی‌های انعقادی مهم‌ترین اثرات جانبی در مصرف L-آسپاراژیناز است که می‌تواند منجر به ترومبوزیس درون جمجمه‌ای یا هموراژی گردد (۸). از عوامل محدود کننده در درمان با L-آسپاراژیناز، ایجاد حساسیت بالا می‌باشد که محدوده آن از واکنش‌های آلرژیک ملایم تا شوک آنافیلاکتیک می‌باشد. از آن‌جا که L-آسپاراژینازهای حاصل از اشریشیا کلی و اروینیا کریزانتمی از نظر ایمنی‌زایی متفاوت هستند، این دو می‌توانند یک درمان متناوب، برای بیمارانی با حساسیت بالا را فراهم نمایند (۷). به علت فعالیت ضدتوموری L-آسپاراژینازها، تلاش می‌شود تا نیمه عمر این ماده در خون افزایش یابد. از جمله کارهای صورت گرفته، به دام انداختن آنزیم در لیپوزوم‌ها یا میکروکپسول‌ها (توسط پیوند کووالان به ماکرو ملکول‌هایی مثل دکستران، آلبومین یا مونومتوکسی پلی اتیلن گلیکول) است. اما متأسفانه هیچ‌کدام از این کارها، نتوانسته‌اند زیان‌های درمانی L-آسپاراژیناز را از بین ببرند (۱۰ و ۱۱). در نتیجه دانشمندان به دنبال شناسایی آنزیم‌های جدید با ویژگی‌های بهتر با مطالعه آنزیم مشابه در باکتری‌های دیگر هستند. کاربرد درمانی L-آسپاراژینازهای باکتریایی منجر به یک پاسخ ایمنی می‌شود که می‌تواند تولید IgE یا دیگر ایمونوگلبولین‌ها را تحریک کند. با توجه به این مطالعات، تغییرات متعددی انجام شده تا با درنظر گرفتن پارامترهای فارماکودینامیک، اثرات ایمونولوژیک را به حداقل برسانند (۴ و ۱۱). از این رو توجه زیادی به باکتری‌های مهندسی شده به منظور افزایش کارایی کاتالیتیکی L-آسپاراژیناز انجام شده است. بدین ترتیب امکان پایداری بیشتر کاتالیت‌ها با تأثیرات جانبی کم‌تر فراهم شده است (۱۲). سمیت آنزیم در درمان، مربوط به فعالیت L-گلوتامینازی آن است. درنتیجه L-آسپاراژینازهایی که تمایل بیشتری برای L-آسپاراژین و تمایل کم‌تری برای L-گلوتامین دارند در مسیر درمان ضدسرطانی می‌توانند مشکلات کم‌تری را ایجاد کنند (۴). هدف از تحقیق حاضر، کلونینگ، تعیین توالی و بیان یک آنزیم L-آسپاراژیناز جدا شده از باکتری اروینیاکریزانتمی سویه DSM 4610 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی ژن آسپاراژیناز: سویه استاندارد DSM4610 باکتری اروینیا کریزانتمی از کشور آلمان تهیه گردید. در ابتدا فعالیت پکتولیتیکی سویه تهیه شده با استفاده از کشت Soft Rod تایید شد. باکتری تایید شده بر روی محیط نوترینت آگار (دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت) کشت شد و DNA ژنومی آن توسط روش جذب روی فیبر شیشه (استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Roche آلمان) استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی شد. در این مرحله پرایمرهای Echr Asn F (5'-GATGGAAAGATGGTTTAAATCTC-3') و Echr Asn R1 (5'-GTCAATAAGTATGGAAATACTC-3')

برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از توالی موجود در بانک ژن (NCBI) طراحی گردید.

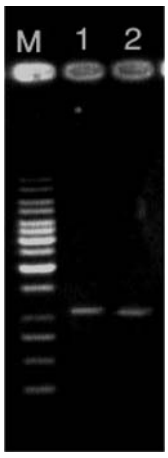
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با پرایمرهای طراحی شده جهت جداسازی ژن آسپاراژیناز از DNA ژنومی باکتری به صورت ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال در دمای ۵۳/۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد هرکدام به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور گسترش نهایی قرار داده شد. سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. پس از مشاهده ژل، باند مورد نظر از ژل جدا شد. تخلیص DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (ساخت شرکت Roche آلمان) انجام گردید. سپس غلظت DNA مورد نظر اندازه گیری و با استفاده از کیت T/A کلونینگ شرکت فرمنتاز (کشور آلمان) مرحله الحاق ژن در ناقل pTZ57R/T انجام شد. DNA حاصل از مرحله الحاق برای ترانسفورماسیون در سلول‌های مستعد مورد استفاده قرارگرفت. سپس DNA نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت Roche آلمان) استخراج شد و نمونه برای تعیین توالی به شرکت MACROGENE کره جنوبی ارسال گردید.

ب) کلونینگ ژن آسپاراژیناز: در مرحله الحاق، ابتدا DNA هدف و ناقل با آنزیم‌های برش‌دهنده یکسان برش داده شد. پس از دفسفریلاسیون با آنزیم آلکالین فسفاتاز، توسط آنزیم DNA لیگازفاژ T4 (شرکت Fermentase کشور آلمان) اتصال انجام گرفت. سپس این وکتور نوترکیب به وسیله‌ی ترانسفورماسیون به درون سلول مستعد (میزبان) انتقال داده شد. پس از استخراج پلاسمید، به وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، هضم آنزیمی، تعیین توالی، الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی و تأیید انجام گرفت.

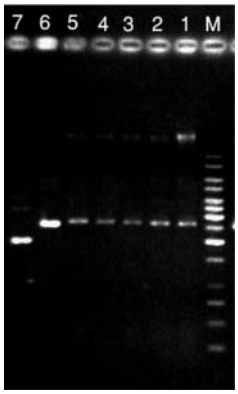
ج) هضم آنزیمی ناقل *pAED4*: از ناقل pAED4 (سیستم pET) (شرکت Novagen کشور آلمان) به منظور کلون کردن و بررسی بیان ژن استفاده شد. از دو آنزیم *NdeI* و *HindIII* (شرکت Fermentase کشور آلمان) برای برش ناقل استفاده گردید.

د) الحاق قطعه هدف با ناقل برش خورده: پس از تکثیر قطعه هدف و ورود به درون ناقل pAED4، انتقال به سلول میزبان انجام شد. با استفاده از آنزیم لیگاز T4 الحاق انجام گردید.

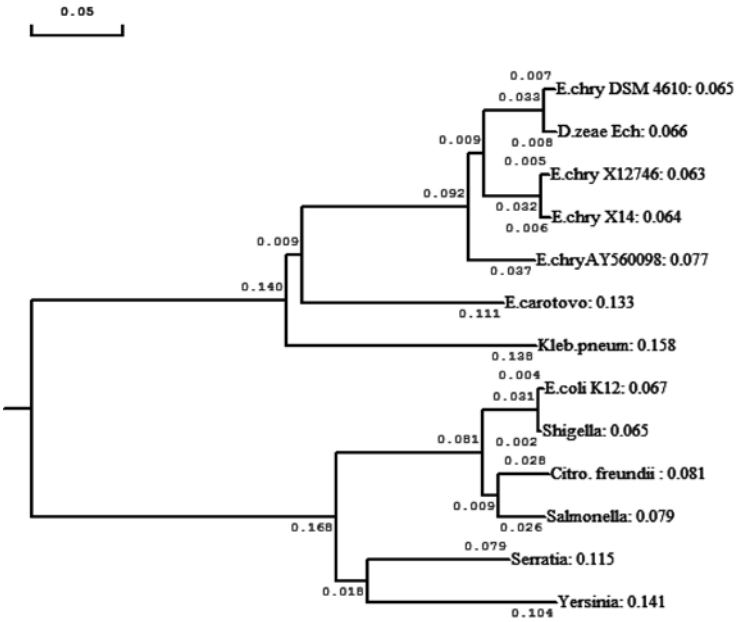
ه) بیان ژن آسپاراژیناز: سیستم pET، از قوی‌ترین سیستم‌هایی است که تا به حال برای کلونینگ و بیان آزمایشگاهی پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیا کلی شناخته شده است. سوش‌هایی از باکتری اشریشیا کلی که به عنوان سلول میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرند حاوی ژن کد کننده RNA-پلی‌مراز T7 می‌باشند. اساس القاء در این روش، استفاده از IPTG (۰/۴ مولار) می‌باشد. به منظور بیان ژن آسپاراژیناز از سلول مستعد اشریشیا کلی BL21(DE3) استفاده شد. ترانسفورماسیون به روش شوک



شکل ۱: نتایج الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱و۲) واکنش PCR و ستون M) مارکر 1kb.

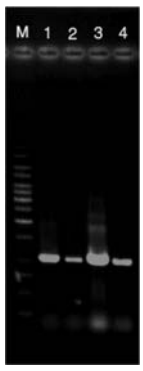


شکل۲: الگوی الکتروفورز پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T. ستون‌های ۵-۱) پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حاوی ژن آسپاراژیناز، ستون ۶) (کنترل مثبت) پلاسمید حاوی ژن آسپاراژیناز، ستون ۷) (کنترل منفی) پلاسمید بدون ژن آسپاراژیناز و ستون M) مارکر 1kb.



نمودار ۱: درخت فیلوژنی آسپاراژیناز از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه با استفاده از نرم افزار DNAMAN.

حرارتی انجام گردید و از پلاسمید نوترکیب pAED4 واجد ژن کلون شده آسپاراژیناز استفاده گردید. سپس باکتری روی محیط LB آگار (ساخت شرکت Roche آلمان) حاوی آمپی‌سیلین کشت و یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس یک کلنی از باکتری رشد یافته، به ۲/۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین تلقیح شده و به مدت ۶-۵ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مشاهده رشد باکتری و کدورت محیط، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین اضافه و



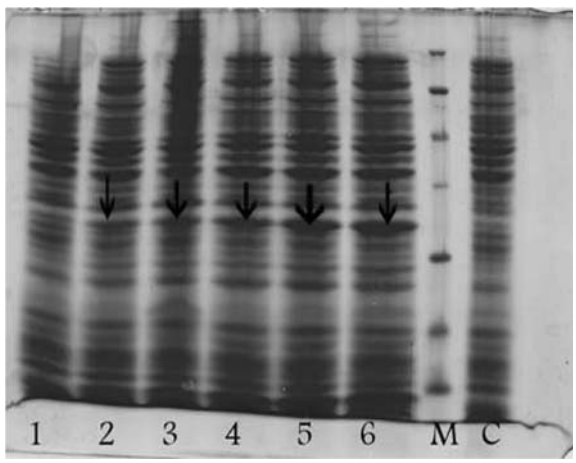
شکل ۳: الگوی الکتروفورز واکنش PCR با استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون‌های ۴-۱) واکنش PCR روی ژن آسپاراژیناز کلون شده در وکتور pTZ57R/T. ستون M) مارکر 1kb.

به مدت یک شب در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس محیط یاد شده به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر LB مایع حاوی آمپی‌سیلین و گلوکز ۱ درصد منتقل گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به جذب نوری ۰/۴ تا ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرار داده شد. از نمونه BL21(DE3) ترانسفورم شده با پلاسمید pAED4-ans به عنوان زمان صفر (قبل از القاء) استفاده گردید. پس از نمونه برداری، ۴۰۰ میکرو لیتر IPTG ۱۰۰ میلی مولار به محیط اضافه شد و محیط کشت مجدداً در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. نمونه برداری از محیط کشت حاوی باکتری (BL21(DE3)) ترانسفورم شده با پلاسمید pAED4-ans) در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساعت پس از القا انجام گردید. بررسی پروتئین بیان شده روی ژل آکریل آمید انجام گرفت. پس از نمونه برداری از ژل SDS-PAGE برای مشاهده باند و محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد. از هر دو روش کوماسی بلو و نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی استفاده گردید.

نتایج

با جفت پرایمر Echr Asn F و Echr Asn R1 باندهای مناسب و قوی در تمامی دماها مشاهده گردید. اما دمای ۵۳/۵°C

به عنوان بهترین دما برای تکثیر ژن و استفاده در T/A Coloning انتخاب گردید (شکل ۱). پس از الحاق ژن آسپاراژیناز نمونه اروینیا کریزانتمی DSM 4610 با وکتور pTZ57R/T و ترانسفورماسیون در سلول‌های مستعد و کشت آن‌ها بر روی محیط LB حاوی ۱۰۰mg/ml آمپی‌سیلین، کلون‌های ترانسفورم شده (سفید رنگ) شناسایی و مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلاسمید نوترکیب از سلول‌ها استخراج شد و از نظر وزن مولکولی با پلاسمید pTZ57R/T بدون ژن آسپاراژیناز و واجد ژن آسپاراژیناز مقایسه گردید (شکل ۲). برای ارزیابی موفقیت کلون‌سازی پس از استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول‌ها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی پلاسمید نوترکیب انجام گرفت. PCR انجام شده با پرایمرهای Echr Asn F و Echr Asn R1 روی ژن آسپاراژیناز کلون شده در وکتور از باکتری اروینیا کریزانتمی DSM 4610 انجام و سپس بر روی ژل آگارز الکتروفورز انجام گرفت (شکل ۳). به منظور تعیین توالی ژن آسپاراژیناز غلظت ۵µg از ژن آسپاراژیناز کلون شده در ناقل pTZ57R/T به ازای هر پرایمر تهیه و سپس تعیین توالی توسط شرکت MACROGENE کره جنوبی انجام شد. با استفاده از نرم افزار DNAMAN مناطق دارای هم‌پوشانی بین قطعات مختلف DNA تعیین توالی شده، با توالی مرجع موجود در بانک ژن مقایسه گردید (نمودار ۱). طول ژن



شکل ۴: الگوی ژل SDS-PAGE (% 15) در زمان‌های مختلف پس از القا با IPTG 1mM. ستون۱) نمونه سلول BL21(DE3) ترانسفورم شده با پلاسمید pAED4-ans قبل از القا. ستون‌های ۶-۲) نمونه سلول BL21(DE3) ترانسفورم شده در زمان‌های برداشت پس از القا (به ترتیب از ساعت اول تا پنجم). ستونM) مارکر پروتئینی LMW. ستونC)کنترل منفی(سلول BL21(DE3) بدون ترانسفورم).

آسپاراژیناز در باکتری اروینیا *bp* ۱۰۴۷ بود. توالی این ژن در بانک ژن با عنوان توالی باکتری اروینیا کریزانتمی سویه DSM 4610 به نام نویسندگان مقاله ثبت گردید. پس از الحاق ژن آسپاراژیناز در وکتور pAED4 و ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب در سلول مستعد DH5α و کشت آن‌ها بر روی محیط LB حاوی ۱۰۰mg/ml آمپی‌سیلین، کلون‌های ترانسفورم شده (مثبت) استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلاسمید نوترکیب استخراج شده وزن مولکولی در حدود ۴۳۷۲bp را داشت. ارزیابی وزن مولکولی پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE نشان داد که وزن تقریبی پروتئین در محدوده ۳۷/۵ کیلودالتون می‌باشد (شکل ۴).

بحث

در این پژوهش با تعیین توالی ژن L-آسپاراژیناز II اروینیا کریزانتمی سویه DSM 4610 مشخص شد که ORF آن حدود ۱۰۵۰ جفت باز می‌باشد. این ORF پروتئینی به طول ۳۴۸ اسید آمینه را کد می‌کند. اما در مطالعه‌ای که در سال۱۹۸۸ توسط فیلوپا (Filupa) و همکاران بر روی اروینیاکریزانتمی سویه NCPPB 1125 انجام شد، طول ژن آسپاراژیناز در باکتری اروینیاکریزانتمی را ۱۰۴۷ جفت باز گزارش نمودند که پروتئینی به طول ۳۴۸ اسید آمینه را کد می‌کند (۱۳). در این مطالعه با نرم‌افزار DNAMAN، مقایسه توالی نوکلئوتیدی اروینیا کریزانتمی DSM 4610 با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن، ۹۶/۹۵ درصد تشابه را نشان داد و در ۳۰ نوکلئوتید تفاوت دیده شد، اما نوکلئوتیدهای دیگر به طور کامل مشابه بودند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط کوتزیا (Kotzia) و همکاران انجام دادند، ژن L-آسپاراژیناز II اروینیاکریزانتمی سویه ۳۹۳۷ تعیین توالی نمودند و با مقایسه آن با توالیL-آسپاراژیناز II اروینیاکریزانتمی سویه DSM 4610 مشخص شد که ۹۱ درصد این دو توالی کاملا یکسان می‌باشد. هم‌چنین توالی آمینواسیدی L-آسپاراژیناز چند گونه اروینیا با هم مقایسه شد. ۷۷-۷۵ درصد همولوژی بین آنزیم‌های اروینیا کریزانتمی و اروینیا کاروتوورا مشاهده شد، هم‌چنین مقایسه زیرگونه‌های مختلف اروینیا نشان داد که ۹۱ درصد همولوژی بین اروینیا کریزانتمی سویه ۳۹۳۷ و اروینیا کریزانتمی سویه NCPPB 1125 وجود دارد (۴). در سال ۱۹۷۴

مایتا (Maita) و همکاران با مقایسه، توالی آمینواسیدی آسپاراژیناز اروینیا کریزانتمی و اشریشیا کلی نشان دادند که این دو پروتئین ۴۶ درصد شباهت به یکدیگر دارند (۱۷). گیلبرت (Gilbert) و همکاران در سال ۱۹۸۶ با کلون سازی ژن آسپاراژیناز II اروینیا کریزانتمی سویه NCPPB 1066 در وکتور pUC9 در دو جهت، در باکتری اشریشیا کلی دو پلاسمید نوترکیب pASN32 و pASN30 ایجاد نمودند. نتایج محققین یاد شده نشان داد که هر دو پلاسمید سطح مشابهی از آسپاراژیناز را تولید می‌کنند. این مساله نشان دهنده کلون شدن ناحیه پروموتر ژن می‌باشد. هم‌چنین با کلون‌سازی ژن آسپاراژیناز اروینیا کریزانتمی در پلاسمید pUC9 و pKT230 انتقال در درون اروینیا کاروتوورا سویه SCI 193 مشخص شد که میزان بیان در پلاسمید pKT230 حاوی آسپاراژیناز در اروینیا کاروتوورا سه برابر بیشتر از تولید آسپاراژیناز در اروینیا کریزانتمی سویه ۱۰۶۶ می‌باشد. یکی از مزایای اروینیا کاروتوورا نسبت به اروینیا کریزانتمی، نداشتن آنزیم پروتئاز (پروتئاز منفی) می‌باشد (۱۸).

در مطالعه حاضر برای بررسی بیان ژن در حضور گلوکز، این ماده به محیط کشت اضافه شد. نتایج نشان داد که در حضور گلوکز، تولید آسپاراژیناز در اروینیا کریزانتمی سرکوب می‌شود و این نشان می‌دهد که ناحیه تنظیمی ژن باید شامل یک توالی شناساگر برای پروتئین فعال کننده کاتابولیت باشد. در مقابل، بیان ژن کلون شده در اشریشیا کلی با گلیسرول، سرکوب نمی‌شود. این مساله می‌تواند نشان دهنده متفاوت بودن مکانیسم‌های سرکوب گلیسرول و گلوکز در آسپاراژیناز، باشد (۱۸).

Khushoo و همکاران در سال ۲۰۰۴، از توالی Pel B leader به منظور به دست آوردن آسپاراژیناز نوترکیب پری‌پلاسمی استفاده نمودند. در این مطالعه ژن ansB کد کننده آسپاراژیناز II در اشریشیا کلی سویه K-12 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، تکثیر گردید و در دو طرف پرایمرها جایگاه برشی آنزیم‌های *BamHI* و *NdeI* قرار داده شد (بدون توالی سیگنال پپتید طبیعی ژن). سپس در وکتور بیانی pET14b حامل قطعه فیوژن 6x HisTag در N-ترمینال، کلون گردید. در مرحله بعد نیز درون pET22b برش داده شده با آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI*، زیرهمسانه سازی انجام شد (۱۹).

در مطالعه حاضر وزن مولکولی پروتئین روی ژل SDS-PAGE، ۳۷/۵ کیلو دالتون بود. با توجه به این که در مطالعات قبلی ما وزن مولکولی پروتئین در اشریشیا کلی، ۳۵ کیلودالتون تشخیص داده شده بود، ۲/۵ کیلودالتون افزایش وزن مولکولی ناشی از وجود 6XHisTag در N-ترمینال پروتئین می‌باشد. اما یکی از ویژگی‌های مهم اشریشیا کلی، بیان پروتئین در فاز ایستای رشد است. چون بیان پروتئین هدف به مقدار زیاد با القای سلول‌ها در فاز ایستا به دست می‌آید (۲۱)، مشابه نتایجی که با القای سلول‌ها در انتهای فاز لگاریتمی رشد به دست آمد. درتحقیق حاضر از سیستم pET که یکی از بهترین سیستم‌های بیان ژن محسوب می‌شود استفاده شد (۲۲). ژن‌های هدف کلون شده در پلاسمیدهای pET تحت کنترل قوی رونویسی باکتریوفاژ T7 و سیگنال های ترجمه می باشند و بیان توسط منبعی از RNA-پلی مراز T7 در سلول میزبان القا می‌شود. یکی از ویژگی‌های ارزشمند سیستم pET این است که چون در سلول‌های اشریشیا کلی سویه BL21، پروتئازهای خارج سلولی و پروتئازهای متصل به دیواره سلولی بسیار کم هستند، فعالیت پروتئازی آن بر روی محصول نیز کم می‌باشد (۲۲). در این سیستم، با اضافه کردن پروموتر Lac T7/T7، میزبان‌های PlysE و PlysS و افزودن گلوکز به محیط می‌توان کنترل بیان را انجام داد. استفاده از میزبان‌های PlysS در مورد ساختارهای حاوی توالی سیگنال برای جداسازی از فضای پری‌پلاسمی مناسب نیستند. هم‌چنین در هنگام استفاده از پروموتر Lac T7 میزان بیان در میزبان‌های PlysS نسبت به میزبان‌های فاقد آن، کاهش داشت. با توجه به موارد یاد شده در این پژوهش، برای جلوگیری از تولید بیش از حد لیزوزیم، از میزبان‌های فاقد PlysS استفاده گردید.

در صورت توکسیک بودن ژن، اضافه کردن ۱-۰/۵ درصد گلوکز به محیط برای نگه داری پایداری پلاسمید ضروری است. با توجه به این که در این پژوهش از میزبان‌های فاقد PlysS استفاده گردید، قبل از القا سلول‌ها با IPTG، گلوکز به محیط کشت اضافه شد. زیرا گلوکز در میزبان‌های بیانی لیزوژنیک، بیان پایه پروتئین هدف را در پایین‌ترین سطح نگه می‌دارد (۲۲).

در این تحقیق برخلاف کارهای Khushoo و همکاران در سال

۲۰۰۴، با توجه به این که آنزیم آسپاراژیناز دارای سیگنال پپتید است، با برش توسط دو آنزیم *NdeI* و *HindIII*، ناحیه سیگنال پپتید وکتور، حذف گردید.

نتیجه گیری

شناسائی L- آسپاراژیناز نوترکیب اروینیا کریزانتمی در این تحقیق می‌تواند زمینه ساز استفاده کاربردی از آن به عنوان داروی ضدسرطان باشد. از این رو انجام پژوهش‌های بیشتر به منظور ارزیابی اثرات کلینیکی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل محترم بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به دلیل همکاری صمیمانه 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. Huser A, Kloppner U, Rohm K. Cloning, sequence analysis and expression of ansB from *Pseudomonas fluorescens*, encoding periplasmic glutaminase/asparaginase. FEMS Microbial. 1999; 178:327-335.
5. Kotzia GA, Labrou NE. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. J Biotechnol. 2005; 119: 309-323.
6. Lubkowski J, Palm GJ, Gilliland GL, Derst C, Rohm K, wlodawer A. Crystal structure and aminoacid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase. J Biochem. 1996; 241:201-207.
7. 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.
8. 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. Enz And Microbiol Technol. 2006; 39:1457-1463.
9. Kozak M, Borek D, Janowski R, Jaskolski M. Crystalization and preliminary crystallographic studies of five crystall forms of *Escherichia coli* L-asparaginaseII (Asp90 Glu mutant). Acta crystallogr D Biol Crystallogr. 2002; 58:130-132.
10. 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.
11. 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.
12. Maure AM. Therapy of Acute lymphoblastic leukemia in childhood. J Blood. 1980; 56: 1-10.
13. Filupa D, Nagle JW, Pulford S, Anderson DM. Sequence of L-asparaginase gene from *Erwinia chrysanthemi* NCPPB1125. Nucleic Acid Res. 1988; 16:10385.
14. Ye RW, Tao W, Bedzyk L, Young T, Chen M, Li L. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grownunder anaerobic condition. J Bacteriol. 2002; 182:4458-4465.
15. Minton NP, Bullman HM, Scawen MD, Atkinson T, Gilbert HJ. Nucleotide sequence of the *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 L-asparaginase gene. J Gen Microbial .1986; 46:25-35.
16. Tilsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Brown S, Dijl JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. J Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64: 515-547.
17. Maita T, Morokuma K, Mastuda G. Amino acid sequence of L-asparaginase from *E.coli*. J Biochem. 1974; 76:1351-1354.

18. Perlman D, Halvorson HO. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic signal peptides. J Mol Biol. 1983; 167:391-409.
19. Khushoo A, Pal Y, Singh BN, Mukherjee KJ. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginaseII. protein Exp and purify. 2004; 38:29-36.
20. David T, Bonthron. L-AsparaginaseII of *Escherichia coli* K-12: cloning, mapping and sequencing of the ansB gene. Gene. 1990; 91:101-105.
21. Sinclair K, warner JP, Bonthron DT. The ASPI gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. J Gen Microbial. 1994; 144:37-43.
22. Catalog pET system manual (Novagen) tenth edition; 2002.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 1, May 2010

Cloning, Sequence analysis, and expression of L-Asparaginase obtained from *Erwinia chrysanthemi*

Razieh Afrasiabi[1], Khosrow Aghaiypour[2], Farshid Kafilzadeh[3], Sadighe Safaviyeh[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Assisstant Professor, Department of Biotecnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[4]M.Sc., Department of Biotecnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Abstract

Background and objectives: L-asparaginases enzyme is an effective drugs for treatment of lymphoblastic leukemia and Non-Hodgkin's lymphoma. *Escherichia coli* and *Erwinia* strains specially *Erwinia chrysanthemi* are more important producers of this enzyme. The aim of this study was survey on L-asparaginase enzyme obtained from *Erwinia chrysanthemi* DSM4610.

Materials and methods: After bacterial genomic DNA extraction, a PCR procedure was performed with specific primers, Echr Asn F and Echr Asn R1. At the next step, the amplified DNA segment were ligated in a pTZ57R/T vector and after transformation into *E. coli* DH5α, the recombinant plasmids were extracted. After sequencing, the results were analyzed by DNAMAN software. By designin its expression primers, the gene was cloned in a pAED4 vector and after transformation into *E.coli* BL21(DE3) cells, its expression was assessed by SDS-PAGE analysis.

Results: The sequence of the isolated gene from *Erwinia chrysanthemi* DSM4610 was different from other similar genes in Gene Bank and was assigned with the accession number: JF972567 in Gene Bank. The most expression was found in the condition of 0.5 mM of IPTG, LB broth media and 37 °C. SDS-PAGE analysis showed 37.5 KD protein.

Conclusion: Results revealed that the L-asparaginase enzyme obtained of *Erwinia chrysanthemi* has proper features for further study as an antileukemia enzyme.

Keywords: L- asparaginase, *Erwinia chrysanthemi*, pAED4, SDS-PAGE

Correspondence to: Razieh Afrasiabi
E-mail: razi114@yahoo.com
Tel: +989173810368
Journal of Microbial World 2010 3(1): 7-15