

مقاله تحقیقی

کلونینگ و بیان اسپاراژیناز در باکتری *Escherichia coli*

مریم قانع^{۱*}، بیژن بمبئی^۲، فاطمه تابنده^۳، مژگان قانع^۴

۱. استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، گروه زیست شناسی، اسلامشهر، ایران
۲. استادیار بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه صنایع تخمیری، کرج، ایران
۳. استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه صنایع تخمیری، کرج، ایران
۴. کارشناس ارشد شیمی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، گروه شیمی، اسلامشهر، ایران

*مسئول مکاتبات: دکتر مریم قانع، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، گروه زیست شناسی، اسلامشهر، ایران، تلفن ۰۹۱۲۵۱۳۳۸۱۵، صندوق پستی ۳۶۹/۳۳۱۳۵، پست الکترونیکی: maryamghaneh@yahoo.com
محل انجام تحقیق: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۶

چکیده

آنزیم L-اسپاراژیناز هیدرولیز اسید آمینه L-اسپاراژین به L-اسید اسپاراتات و آمونیوم را کاتالیز می کند. آنزیم-های با فعالیت اسپاراژینازی، نقش مهمی در متابولیسم کلیه موجودات به عهده دارند و در داروسازی نیز حایز اهمیت هستند. آنزیم اسپاراژیناز II، یکی از داروهای شناخته شده در درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد است. در این تحقیق به منظور دستیابی به مقادیر بالای آنزیم، ژن اسپاراژیناز II (ansB) با تکنیک PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از باکتری *E. coli* DH5 α جدا شد. قطعه مورد نظر که اندازه‌ای حدود ۱۰۴۷bp داشت، با دو آنزیم *NdeI* / *Sac I* بریده شد و در جایگاه مشابه در پلاسمید pET21a در پایین دست پروموتور T7 کلون شد. پلاسمید نوترکیب، وارد باکتری *E. coli* DH5 α گردید. پس از تایید کلونینگ با استفاده از PCR و برش آنزیمی، پلاسمید نوترکیب، وارد باکتری *E. coli* BL 21 گردید و پس از القاء با IPTG با غلظت ۱ میلی مولار، بیان ژن با استفاده از SDS-PAGE و سنجش فعالیت آنزیمی تایید شد. حضور باند حدوداً ۳۵ کیلودالتونی در SDS-PAGE بیان ژن را اثبات نمود. برای سنجش فعالیت، از روش سنجش میزان آمونیاک تولید شده، استفاده شد. روش سنجش فعالیت آنزیمی میزان ۸۶ Unit/ml آنزیم را نشان داد. پروموتور قوی T7 منجر به تولید مقادیر بالایی از آنزیم گردید؛ به طوری که فعالیت آن بیش از ۲۰ برابر فعالیت آن در سویه وحشی بود. به علاوه، میزان بالای پروتئین تولید شده در محلول رویی نشانگر تولید خارج سلولی پروتئین فوق است که خالص سازی آن را آسان تر خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: اسپاراژیناز II، بیان، فعالیت آنزیمی، *ansB.E. coli*

مقدمه

L-اسپاراژیناز (L-اسپاراژیناز آمیدوهیدرولاز) نوع L-اسپاراژیناز وجود دارد (۱،۲). L-اسپاراژیناز I، یک آنزیم داخلی است و L-اسپاراژیناز II، خارج-سلولی بوده و در شرایط کمبود نیتروژن تولید می-کند. دو

در دسترس است (۲۰). نظر به اهمیت آنزیم آسپاراژیناز در درمان بیماران مبتلا به سرطان خون، تولید آنزیم فوق در مقیاس بالا، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تحقیقات اخیر ما در خصوص غربال-گری سویه‌های باکتری *Escherichia coli* جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز، نشان داد که سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* حتی پس از القای بی-هواری، میزان کمی از پروتئین فوق را تولید می‌کنند (۲۹). از آنجایی که تولید صنعتی و حتی نیمه-صنعتی آنزیم‌های صنعتی و دارویی، نیازمند کلون-هایی است که قادر به تولید آنزیم موردنظر در حد مطلوب باشند، در این تحقیق با هدف دستیابی به مقادیر بالای آنزیم آسپاراژیناز II، با استفاده از روش-های مهندسی ژنتیک، آسپاراژیناز II به صورت نو ترکیب در وکتور بیانی تحت کنترل پروموتور قوی بیان شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری و پلاسمیدها

باکتری‌های *E. coli* شامل سویه‌های DH5 α و BL21 از پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست-فناوری، به ترتیب برای جداسازی و بیان ژن استفاده شدند. پلاسمید pET21a (Novagene USA) برای بیان ژن استفاده شد.

آماده‌سازی قطعه حاوی ژن آسپاراژیناز

برای کلونینگ ژن آسپاراژیناز (ansB) در پلاسمید pET21a، پرایمرهایی طراحی شد که دارای جایگاه برش آنزیمی *NdeI/SacI* موجود در پلاسمید فوق باشد. ژن آسپاراژیناز با استفاده از دو پرایمر F14 و R1 و با کمک آنزیم DNA *Pfu polymerase* (Roche, Germany) از ژنوم سویه DH5 α تکثیر شد. برای تکثیر ژن ansB، باکتری *E. coli* سویه DH5 α در محیط مغذی Yeast Extract (LB) Luria Bertani (Agar 16g, NaCl 10g, Pepton 10g, 5g, dH₂O 1 lit) کشت داده شد. پس از رشد (مرحله لگاریتمی) و جداسازی سلول‌ها از محیط کشت با

شود (۳). این دو نوع آنزیم از لحاظ بیوشیمیایی و ژنتیکی، کاملاً متفاوتند. L-آسپاراژیناز نوع II در سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت یافت می‌شود و تاکنون از بسیاری بافت‌های جانوران، گیاهان و باکتری‌ها جدا شده است. سوپسترا و محصول این آنزیم، هر دو نقش مهمی در متابولیسم کلیه موجودات بازی می‌کنند. بنابراین، نقش فیزیولوژیک این آنزیم، بسیار بوده و کنترل بیان و فعالیت آن موجب کنترل تعادل بین میزان اسیدهای آمینه بدن می‌شود. از سوی دیگر، چون این آنزیم، آمونیاک تولید می‌کند و افزایش غلظت آن موجب افزایش pH بدن می‌گردد، احتمالاً در کنترل سیستم بفری مایعات بدن نیز نقش دارد. این آنزیم، آنزیم مهمی است و به عنوان دارو، در درمان انواع لنفوما و لوکمیا به کار می‌رود (۴). نقش آسپاراژیناز II در درمان لوکمای لنفولیتیک به این دلیل است که سلول‌های سرطانی، فاقد توانایی سنتز اسیدآمینه آسپاراژین بوده و وابسته به L-آسپاراژین خارجی هستند (۵،۶)، در مقایسه، سلول‌های طبیعی، قادر به سنتز آسپاراژین در سیتوپلاسم خود هستند (۷). با تجزیه L-آسپاراژین توسط L-آسپاراژیناز II، سلول‌های سرطانی، در معرض فقر آسپاراژین قرار گرفته و از بین می‌روند. L-آسپاراژیناز نوع II، از تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند *Escherichia coli* (۸، ۹)، *Erwinia cartorova* (۱۰، ۱۱)، *Candida utilis* (۱۲)، *Entarobacter aeruginosa* (۱۴)، *Pseudomonas aeruginosa* (۱۵)، *Thermus thermophilus* (۱۶) جدا می‌شود، اما تنها L-آسپاراژیناز تولید شده توسط *E. coli* و *Erwinia chrysanthemi* استفاده بالینی داشته و به‌عنوان دارو کاربرد دارد (۳، ۱۷) و دلیل آن، میل ترکیبی بالا به سوپسترا (۴، ۱۸) و فاکتورهایی است که خالص‌سازی آنزیم از محیط کشت را تحت‌تاثیر قرار می‌دهند (۱۹). در حال حاضر، سه نوع آسپاراژیناز، شامل آسپاراژیناز خالص‌شده از *E. coli*، آسپاراژیناز پگیله (PEG-) *Erwinia* (asparaginase) و محصولی که از *Erwinia chrysanthemi* جدا می‌شود، برای درمان لوکمیا،

PCR مطابق با روش‌های استاندارد (۲۱) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، با آنزیم *pfu* پلیمرز (Roche, Germany) انجام شد.

استفاده از سانتیفریژ، DNA کامل باکتری توسط کیت استخراج DNA ژنومیک (Roche, Germany) و با دستورالعمل شرکت سازنده، خالص گردید.

ansB F14: 5' CACGTA⁺ACTGCAGGAATCATATGG
NdeI

ansB R1: 5' CCGAGCTCGGTACCCGGGCAAGG
SacI

(Roche, Germany). مطابق روش استاندارد بریده شد (۲۱). جهت بررسی برش آنزیمی حاصله، محصول حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز گردید. پلاسمید خطی شده با استفاده از کیت تخلیص DNA (Roche, Germany) مطابق روش شرکت سازنده، از روی ژل استخراج شد.

برنامه زمانی ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۵°C به مدت ۹۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه (۳۰ سیکل)، ۷۴°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) صورت گرفت. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (Merck, Germany) الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱) و با استفاده از کیت خالص‌سازی محصولات PCR (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از روی ژل آگارز خالص شد و با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SacI* که در پرایمرهای F14 و R1 طراحی شده بود، مطابق روش استاندارد (۲۱) بریده شد و از روی ژل آگارز خالص گردید.

کلونینگ ژن اسپاراژیناز

برای کلونینگ ژن ansB در پلاسمید بیانی pET21a، قطعات حاصل از برش آنزیمی مربوط به ژن ansB (Insert) و پلاسمید PET21 (vector) پس از استخراج، مطابق روش استاندارد، به کمک آنزیم T4 DNA ligase (Roche, Germany) اتصال یافت؛ به طوری که ژن ansB در پایین دست پروموتور T7 در میان جایگاه برش آنزیمی *NdeI*، *SacI* قرار گرفت. محصول اتصال با روش شوک حرارتی، مطابق روش استاندارد (۲۱)، به داخل باکتری مستعد DH5α منتقل گردید (۲۱). غربال-گری پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش PCR و برش آنزیمی، مطابق روش استاندارد انجام شد (۲۱). پلاسمید نوترکیب حاصل، pBG نامیده شد.

بیان پروتئین نوترکیب در *E. coli*

برای بررسی بیان، پلاسمید pBG با روش شوک حرارتی مطابق روش استاندارد (۲۱)، وارد باکتری مستعد *E. coli* BL21 شد و بر روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین (Roche, Germany) کشت

آماده‌سازی حامل کلونینگ (وکتور)

DNA پلاسمید pET21a با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Roche, Germany) از کشت باکتریایی خالص شد. DNA پلاسمیدی استخراج شده، از نظر کمیت و کیفیت، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. غلظت DNA پلاسمیدی بر اساس جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وجود جایگاه‌های برش آنزیمی *SacI* و *NdeI* در پرایمرهای F14 و R1، از آنزیم‌های فوق جهت برش پلاسمید pET21 نیز استفاده گردید. پس از استخراج DNA، پلاسمید pET21a با استفاده از دو آنزیم *SacI* و *NdeI*

این محلول جهت سنجش فعالیت آنزیمی و الکتروفورز پروتئین، مورد استفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز پروتئین، به ازای هر میلی‌لیتر مایع رویی مرحله قبل، ۱۲۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) صد در صد اضافه شد و پس از سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰rpm، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C، رسوب مطابق روش استاندارد (۲۱) توسط SDS-PAGE بررسی شد.

تعیین فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز II تولید شده

یک واحد آنزیم آسپاراژیناز II، مقداری از آنزیم است که در مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷°C، ۱ میکرومول آمونیاک را در محیط آزاد می‌سازد. جهت تعیین فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز II، پس از رسوب دادن باکتری از محیط کشت، از محلول رویی و نیز عصاره پری‌پلاسمی باکتری که در مرحله قبل به دست آمده بود، رقت‌های لازم ساخته شد و برای تعیین فعالیت بیولوژیک آنزیم، از روش نسلسر استفاده شد (۲۹).

نتایج

آماده‌سازی قطعه حاوی ژن آسپاراژیناز و حامل کلونینگ (وکتور)

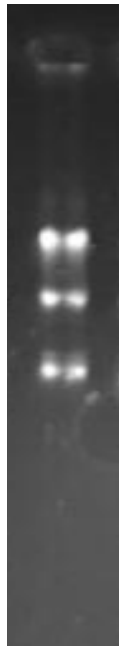
تصویر ۱، ژنوم کامل باکتری را روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می‌دهد. قطعه حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده روی ژل آگارز، با توجه به مارکر، اندازه‌ای حدود ۱۰۴۷pb داشت که با اندازه ژن آسپاراژیناز مطابقت داشت. تصویر ۲، محصول PCR پس از برش آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *SacI* و *NdeI* و تصویر ۳، نتایج حاصل از استخراج پلاسمید pET21a برای آماده‌سازی وکتور را نشان می‌دهند.

غربال‌گری پلاسمیدهای نو ترکیب

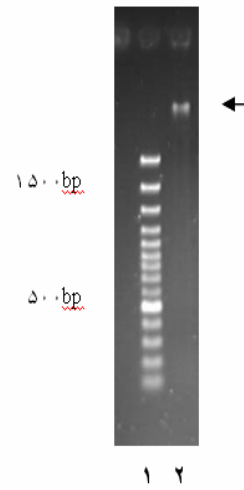
نتایج حاصل از غربال‌گری پلاسمیدهای نو ترکیب در تصاویر ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. قطعه حاصل از PCR با پرایمرهای R1 و F14 و نیز برش DNA

شد. یک کلنی تک از سویه نو ترکیب باکتری *E. coli* و نیز باکتری سویه BL21 حاوی پلاسمید pET21 که در محیط LB جامد کشت داده شده بود، جدا گردید و هر یک در ۳ میلی‌لیتر محیط M9 تغییر یافته با ترکیب $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5g، NaCl 0.5g، KH_2PO_4 0.8g، dH_2O ، Maltose 1g، L-asparagine 10g، 1lit با $\text{pH} = 7$ (۲۹) کشت داده شد و در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه به طور شبانه، گرماگذاری گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه، به داخل فلاسک حاوی ۵۰ml از محیط کشت فوق تلقیح شد و در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه، گرماگذاری شد. هنگامی که پس از گذشت ۲ ساعت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰nm به ۱ رسید (انتهای فاز لگاریتمی)، برای القا، از IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار استفاده شد و به مدت ۴ ساعت در فلاسک در دمای ۳۷°C گرماگذاری گردید و در فواصل زمانی ۱ ساعت، نمونه‌گیری انجام شد. پس از رسوب دادن باکتری، محلول رویی کشت‌های فوق، جهت بیان خارج سلولی و رسوب باکتری، جهت بیان پری‌پلاسمی آسپاراژیناز با استفاده از الکتروفورز پروتئین مطابق روش استاندارد (۲۱)، توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه بیان پری‌پلاسمی آسپاراژیناز II، باکتری‌های فوق به روش زیر جدا شد. برای مطالعه پروتئین‌های پری‌پلاسمی باکتری‌های فوق، کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ سرد شد و با سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، سلول‌های باکتری رسوب داده شد. رسوب سلول‌های باکتری در بافر (TES) Tris-EDTA- Sucrose سرد با ترکیب $\text{pH} = 7$ ، Tris-HCl 0.2M، Sucrose 0.5M، 80.5mMEDTA به میزان ۱۵ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر کشت باکتری مخلوط شد و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه روی یخ سرد شد و با افزودن آب مقطر سرد به نمونه و قرار دادن مجدد آن در یخ، در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی محتویات پری‌پلاسمی باکتری است، جدا شد.

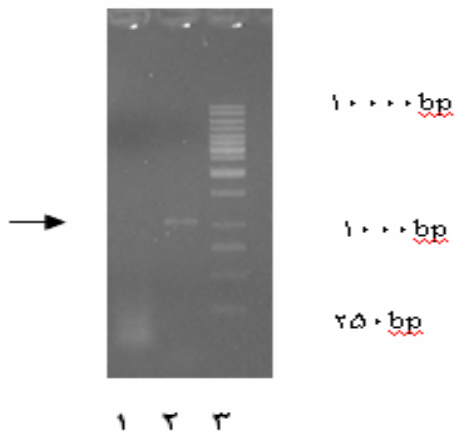
پلاسمید نو ترکیب با آنزیم‌های برش‌دهنده *NdeI*، *SacI*، کلونینگ ژن آسپاراژیناز را تایید کرد.



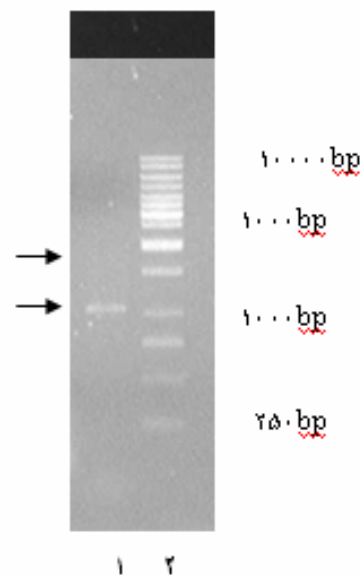
تصویر ۳- الکتروفورز DNA پلاسمید PET21 پس از استخراج از باکتری *E. coli* DH5α



تصویر ۱- الکتروفورز ژنوم کامل *E. coli* DH5α روی ژل آگارز یک درصد. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰۰ pb؛ ستون ۲: ژنوم کامل سویه DH5α.



تصویر ۴- الکتروفورز محصول PCR کلون نو ترکیب. ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲: محصول PCR؛ ستون ۳: مارکر وزن مولکولی ۱ Kb.



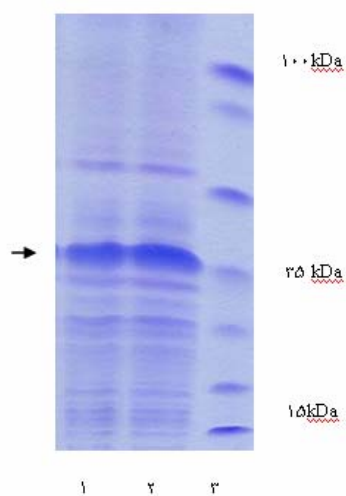
تصویر ۲- الکتروفورز محصول PCR سویه DH5α با پرایمرهای R1 و F14 روی ژل آگارز یک-درصد که با دو آنزیم *Nde I/Sac I* بریده شده است. ستون ۱: محصول PCR برش‌یافته؛ ستون ۲: مارکر وزن مولکولی ۱Kb.

بیان پروتئین آسپاراژیناز در پلاسمید نو ترکیب و تعیین فعالیت آنزیمی

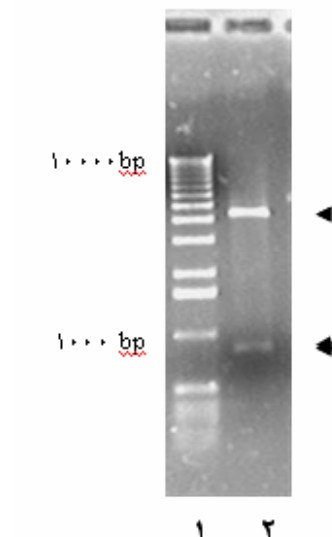
تصویر ۶، بیان پروتئین آسپاراژیناز را ۴ ساعت پس از القا با IPTG، در پلاسمید نو ترکیب نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود، باند حدوداً ۳۵ کیلودالتونی که با اندازه منومر آسپاراژیناز طبیعی مطابقت دارد، نشان‌دهنده تولید

آسپاراژیناز است، به علاوه، میزان تولید آسپاراژیناز در محلول رویی، بسیار بیشتر است.

روش نسلر نشان داد که آنزیم قادر است میزان ۲۳/۵ میکرومول آمونیاک را که معادل ۸۶ Unit/ml است، تولید نماید.



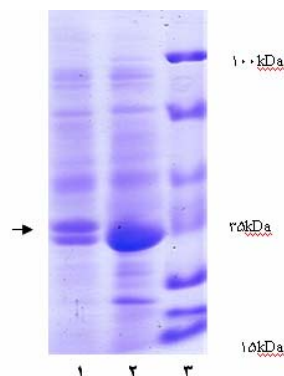
تصویر ۷ - آنالیز SDS-PAGE سوپرناتانت‌های حاوی آنزیم آسپاراژیناز. ستون ۱ و ۲: به ترتیب در ۲ و ۴ ساعت پس از القا؛ ستون ۳: مارکر وزن مولکولی.



تصویر ۵- الکتروفورز محصول اثر دو آنزیم *Nde* *I/Sac* I بر پلاسمید نو ترکیب روی ژل آگارز یک درصد. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی 1kb؛ ستون ۲: قطعات حاصل از برش آنزیمی.

بحث

آنزیم L-آسپاراژیناز، در درمان انواع سرطان، موثر بوده و در حال حاضر، L-آسپاراژیناز تجاری در درمان مولکولی لوکمیی لنفوبلاستیک حاد و ملانوسارکوما، انقلابی بزرگ ایجاد کرده است. لذا، تحقیقات بیشتر در این زمینه، برای دستیابی به میزان قابل ملاحظه آنزیم، حایز اهمیت است. از آن-جایی که برای تولید صنعتی و حتی نیمه صنعتی آنزیم‌های صنعتی و دارویی، به کلون‌هایی نیاز است که قادر به تولید آنزیم موردنظر در حد مطلوب باشند؛ در این تحقیق، پروتئین آسپاراژیناز، با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک به صورت نو ترکیب بیان شد. نتایج تحقیق حاضر، سطوح بالای بیان پروتئین آسپاراژیناز را نشان می‌دهد. پلاسمید pET21a به دلیل داشتن پروموتور قوی T7 برای این منظور استفاده شد. ژن *ansB* از باکتری DH5 α *E. coli* پس از PCR، اندازه‌ای حدود ۱۰۴۷bp را نشان داد، که با مطالعات انجام شده توسط Jennings و Bonthron مطابقت دارد (۲۲،۲۳). مطالعه بیان پروتئین در عصاره پری پلاسمی و محیط کشت باکتری میزبان *E. coli* BL21(DE3) با



تصویر ۶: الکتروفورز عصاره پری پلاسمی باکتری و محلول رویی سویه BL21(DE3) حاوی پلاسمید نو ترکیب توسط SDS-PAGE ۱۳ درصد. ستون ۱: عصاره پری پلاسمی باکتری؛ ستون ۲: محلول رویی، ۴ ساعت پس از القا با IPTG؛ ستون شماره ۳: مارکر وزن مولکولی.

تصویر ۷، آنالیز SDS-PAGE سوپرناتانت‌های حاوی آنزیم آسپاراژیناز در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت پس از القا را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود، میزان تولید آنزیم در زمان ۴ ساعت پس از القا، بیشتر است. تعیین فعالیت آنزیمی به

باکتری *E. coli* بوده و سطوح بالای بیان پروتئین هدف، در صورت القا در فاز سکون رخ می‌دهد (۲۷). در عین حال، حلالیت بالاتر پروتئین نوترکیب و سرعت پایین تجزیه پروتئولیتیک در صورت القاء، در انتهای فاز لگاریتمی، باعث افزایش بیان پروتئین نوترکیب می‌شود (۲۸). در این تحقیق مشاهده شد که القاء در انتهای فاز لگاریتمی، باعث افزایش بیان می‌شود. میزان فوق در مقایسه با نوع وحشی، بسیار بالاتر بوده و بیش از ۲۰ برابر سویه وحشی است (۲۹). نتایج حاصل از این تحقیق، بیان موفقیت‌آمیز پروتئین آسپاراژیناز را نشان می‌دهد. بدیهی است با بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری نوترکیب، میزان بیان بالاتر خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

استفاده از SDS-PAGE باند تقریباً ۳۵ کیلودالتونی را نشان داد که با مطالعات انجام شده توسط Herrmann و Kozak مطابقت دارد (۲۴،۲۵). میزان تولید پروتئین در محلول رویی، بسیار بالاتر از عصاره باکتری بود که این خود، دال بر ترشح خارج سلولی آن است. این مطلب با مطالعات انجام‌شده توسط Bonthron و همکاران که نشان داده بودند پروتئین آسپاراژیناز دارای توالی سیگنال است، مطابقت دارد (۲۲). بررسی فعالیت بیولوژیکی محلول رویی حاوی آنزیم نشان داد که آنزیم قادر است میزان بالایی از آمونیاک معادل ۸۶ Unit/ml را تولید نماید که نشان‌دهنده سطح بالای بیان است. این میزان در مقایسه با مطالعات انجام شده توسط قانع و همکاران که در آن، میزان تولید آسپاراژیناز در محیط کشت عاری از باکتری و عصاره پری پلاسمی باکتری *E. coli* سویه‌های DH5α، K12 و LAB در شرایط بی‌هوازی حداکثر ۳/۶ U/ml بود، بسیار بالاتر است (۲۶). به‌طور معمول، سطوح بالای بیان پروتئین به‌دنبال سرعت بالای رشد رخ می‌دهد (۲۶). بیان بالای پروتئین در فاز سکون، یک ویژگی مهم

منابع مورد استفاده

۱. قانع، م. بمبئی، ب. قانع، م. ۱۳۸۷. غربالگری سویه‌های باکتری *Escherichia coli* جهت تولید resensitve lymphoma cells. J Exptl Med 127: 1053-1080.
۲. Campbellet, H., Mashburn, L., Boys, E., 1967. Two L-asparaginase from *E. coli* their separation, purification and anti tumor activity. Biochem 6: 721-726.
۳. Mathews, W., Brown, H., 1974. Isolation of two L-asparaginase from guinea pig liver. Enzyme 17: 276-280.
۴. Magdy, M., Mohammad, A., 2008. Cloning, purification, characterization and immobilization of L-asparaginase II from *E. coli* W3110. Asian Journal of Biochemistry 3: 337-350.
۵. Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., Anand, S., 2007. A promising chemotherapeutic agent. Crit Rev Biotechnol 27: 45-62.
۶. Broome, J. D., 1968. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in blood, normal tissue, and 6C3HED lymphomas of mice: Differences in asparagine formation and utilization in asparagine sensitive and
۷. Lee, S. M., Wroble, M. H., Ross, J. T., 1989. Lasparaginase from *Erwinia cartorova* an improved recovery and purification process using affinity chromatography. Applied Biochem Biotechnol 22: 1-11.
۸. Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Riolland, X., Nelken, B., 2002. Comparison of *E. coli* asparaginase with *Erwinia* asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies. Blood 99: 2734-2739.
۹. Derst, C., Wehner, A., Specht, V., Rohm, K. H., 1994. State and function of tyrosine residues in *E. coli* asparaginase II. Eur J Biochem 224: 533-540.
۱۰. Khushoo, A., Pal, Y., Singh, B. N., Mukerjee, K. J., 2004. Extracellular expression and single step purification of recombinant *E. coli* L-asparaginase II. Protein Expression Purificant 38: 29-39.

11. Aghaipour, K., Wlodowes, A., Lubkowski, J., 2001. Structural basis for activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry* 40: 5655-5664.
12. Borisova, A. A., Eldarov, M. A., Zgoon, A. A., 2003. Purification and some properties of recombinant *Erwinia cartorova* L-asparaginase expressed in *E. coli* cell. *Biomedit Sinskaya Kimiya* 49: 502-507.
13. Kotzia, G. A., Labrou, N. E., 2007. L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *J Biotechnol* 127: 657-669.
14. Kil, J. O., Kim, G. N., Park, I., 1995. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 749-750.
15. Mukherjee, J., Majumadar, S., Scheper, T., 2000. Studies of nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbial Biotechnol* 53:180-184.
16. El-Bessoumy, A., Sarhan, M., Mansour, J., 2003. Production, isolation and purification of L-asparaginase *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid state fermentation. *J Biochem Mol Biol* 12: 387-393.
17. Prista, A. A., Kyridio, D. A., 2001. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for catalytic activity. *Mol Cell Biochem* 216: 93-101.
18. Avramis, V. I., Panosyan, E. E., 2005. Pharmacokinetic pharmacodynamic relationships of asparaginase formulation: the past, the future and recommendation for future. *Clin Pharmacokinet* 44: 367-393.
19. Schwartz, J., Reeves, Y., Broome, D., 1966. Two asparaginase from *E. coli* and their actions against tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1516-1519.
20. Stecher, A. L., Morgantetti, P., PoliKarpov, I., Abrahao-Neto, J., 1999. Stability of L-asparaginase. An enzyme used in leukemia treatment. *Pharmaceut Acta Helv* 74: 1-9.
21. Pieter, R., Hunger, S., Boos, J., 2011. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 117: 238-249.
22. Sambrook, J., Russell, D. W., Maniatis, T., 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press): 450-475.
23. Bonthron, D. T., 1990. L-asparaginase II of *Escherichia coli* K-12: cloning, mapping and sequencing of the *ansB* gene. *Gene* 91: 101-105.
24. Jennings, M., Beacham, I. R., 1990. Analysis of *E. coli* gene encoding *ansB*. *J Bacteriol* 172: 1491-1498.
25. Herrmann, V., Rohm, K., Schneider, F., 1974. On the substrate specificity of L-asparaginase from *E. coli*. *FEBS Letter* 39: 214-218.
26. Kozak, M., Jurgab, S., 2002. A comparison between the crystal and solution structures of *E. coli* asparaginase II. *Acta Biochem Pol* 49: 509-513.
27. Shorkri, A., Sanden, A. M., Larsson, G., 2002. Growth rate dependent changes in *E. coli* membrane structure and protein leakage. *Applied Microbiol Biotechnol* 58: 386-392.
28. Ou, L., Wang, X., Ding, J., Du, Y., Zhang, H., 2004. Stationary protein overproduction is a fundamental capability of *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 174-180.
29. Galloway, C. A., Sowden, M. P., Smith, H. C., 2003. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques* 34: 524-526.