

مقاله پژوهشی

جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های/استریتومایسس خلیج فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری/شریشیاکلی با Real-time و SDS-PAGE

حدیثه سوfer^۱، کیومرث امینی^{۲*}، سید محمد مسعود شوشتریان^۳

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۳۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم ال آسپاراژیناز کاربرد مؤثر در درمان سرطان لوسمی لنفوبلاستیک دارد. این آنزیم از منابع باکتریایی جدا شده و به صورت تجاری به عنوان داروی ضد سرطان عرضه می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های/استریتومایسس خلیج فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری/شریشیاکلی با Real-time و SDS-PAGE است.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های جنس/استریتومایسس از خلیج فارس جداسازی و توسط تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند و سپس با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن ال آسپاراژیناز از این/استریتومایسس‌ها جدا گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به داخل وکتور بیانی pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نوترکیب با روش شوک با CaCl_2 به باکتری/شریشیاکلی ترانسفورم شد و با استفاده از روش‌های رایج تائید کلونینگ انجام گردید.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد که/استریتومایسس‌های جدا شده از خلیج فارس قادر به تولید آنزیم ال آسپاراژیناز می‌باشند. در نهایت ژن این آنزیم توسط وکتور با موفقیت به باکتری/شریشیاکلی ترانسفورم شد و با بازدهی بالا، آنزیم ال آسپاراژیناز تولید نمود.

نتیجه‌گیری: پیدا کردن سویه‌های باکتریایی جدید تولیدکننده آنزیم ال آسپاراژیناز و استفاده تکنیک مهندسی ژن می‌تواند منجر به عملکرد بهتر این آنزیم‌ها شود و به وسیله آن گام بزرگی در مسیر افزایش و سهولت تولید ال آسپاراژیناز در صنعت داروسازی برداشت.

کلمات کلیدی: ال-آسپاراژیناز، استریتومایسس، لوکمی لنفوبلاستیک

مقدمه

واکنش‌های شیمیایی بشمار می‌روند. به کارگیری هدفمند آنزیم‌ها به منظور مداخله در سیر واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی همواره یکی از موضوعات مورد توجه در صنعت و پزشکی بوده است. ال آسپاراژیناز که اسید آمینه ال آسپارژین را به دو جزء آسپارتیک اسید و آمونیاک می‌شکند از جمله این آنزیم‌هاست (۵). در بین بدخیمی‌های کودکان بیمار، لوکمی‌ها شایع‌ترین بیماری است و از بین لوکمی‌ها، لوکمی لنفوبلاستیک حاد شایع‌ترین شکل آن است که از گذشته، داروهای مختلفی در درمان آن استفاده شده است. در ایالات متحده سالانه ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد لوکمی لنفوبلاستیک حاد جدید بروز می‌کند که دوسوم از بیماران را کودکان تشکیل می‌دهند. مبتلایان به این

گونه‌های/استریتومایسس باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و هوازی هستند که در خانواده اکتینومیسیت‌ها قرار دارند. زیستگاه این گونه‌های باکتریایی خاک است (۱). این باکتری‌ها توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها را دارند (۲، ۳). امروزه آنزیم‌های میکروبی کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارند. متوسط رشد سالانه بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی ۳۳/۳ درصد افزایش داشته است (۴). این باکتری‌ها منبعی در دسترس، اقتصادی برای تولید آنزیم‌های مختلف و تسریع‌کننده

*نویسنده مسئول: کیومرث امینی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پایه، واحد ساوه،
Email: dr_kumarss-amini@yahoo.com
دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
https://orcid.org/0000-0002-6419-3417

تأمین می‌کرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت و شناسایی: نمونه‌گیری آب بر اساس مطالعات قبلی انجام شد که در سه نوبت از عمق ۵۰ سانتی‌متری و از فاصله ۱۵۰ تا ۲۰۰ متری ساحل انجام شد. در نهایت ۲۰ نمونه باکتری‌هایی بر اساس کشت جداسازی گردید. نمونه‌های آب جمع‌آوری‌شده در شرایط استریل تا رقت 10^{-7} رقیق و سپس رقت‌های مختلف روی محیط نوتریت آگار کشت داده شد (۱۳). پلیت‌ها به درون انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز منتقل گردید. نمونه‌های باکتریایی با توجه به مورفولوژی و ساختار میکروسکوپی جدا و از آن‌ها تک کلونی به دست آمد. سپس جهت تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی از خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی شامل تست وژپروسکوئر، تست متیل رد، تست حرکت، تست اندول، تولید سولفید هیدروژن، لایزین دکربوکسیلاز، تست سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، تست اکسیداز و تست کاتالاز استفاده شد.

شناسایی مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: پس از تأیید باکتری /ستریپتومایسس بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی جهت تأیید نهایی جنس /ستریپتومایسس با استفاده از ژن 16 srRNA انجام گردید. به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA (کیت ذخایر مرکز ژنتیک ایران) و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و همچنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول ۱ ذکر گردیده است. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف از مخلوط کردن ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱۰ pmol از پرایمر موردنظر و حجم مناسبی از آب مقطر استریل استفاده شد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل: واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، برای ۳۵ سیکل واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۳۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام آزمایش

بیماری اغلب علائم خستگی، تب و خونریزی و درد استخوانی را داشته، لنفادنوپاتی منتشر، اسپلنومگالی و هیپاتومگالی نیز از یافته‌های شایع بیماری است (۶، ۷). آنزیم ال آسپاراژیناز در پزشکی به عنوان دارویی مؤثر جهت درمان لوکمی لنفوبلاستی حاد سرطان خون شناخته می‌شود. این آنزیم، در مقایسه با سایر داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی سازگاری بسیار بالایی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد. از این رو محققان در تلاش برای دستیابی به آنزیم آسپاراژیناز با توان درمانی بالا و عوارض جانبی کم می‌باشند (۸). جنس /ستریپتومایسس دریایی از نظر تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های خارج سلولی بخصوص آنزیم ال آسپاراژیناز شاخص است. /ستریپتومایسس حداقل دارای دو آنزیم با فعالیت آسپاراژینازی است. ال آسپاراژیناز نوع I (*ansA*) سیتوپلاسمی بوده و میل ترکیبی پایینی برای آسپاراژین دارد؛ در حالی که نوع II (*ansB*) پری پلاسمی بوده و میل ترکیبی بالایی برای آسپاراژین دارد. ال آسپاراژیناز نوع II برخلاف نوع I در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود و خاصیت ضد توموری دارد (۹-۱۱). سلول‌های سرطان خون توانایی سنتز اسید آمینه آسپاراژین در درون سیتوپلاسم خود ندارند. از این رو، این سلول‌ها جهت سنتز پروتئین‌ها می‌بایست آسپاراژین مورد نیاز خود را از سرم تأمین نمایند. استفاده از آسپاراژیناز سبب کاهش میزان آسپاراژین سرم شده و سلول‌های سرطانی در شرایط فقر آسپاراژین قرار می‌گیرند و رشد آن‌ها متوقف می‌شود و یا حتی منجر به مرگ آن‌ها می‌شود. در همین راستا در رژیم درمانی علیه سرطان خون، آسپاراژیناز نیز در کنار شیمی‌درمانی تجویز می‌گردد (۱۲). با توجه به اینکه این دارو از مؤثرترین داروها در مرحله القائی و تشدیددی درمان لوکمی لنفوبلاستیک حاد است، هدف از این مطالعه جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های /ستریپتومایسس خلیج فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری /شریشیاکلی با Real-time و SDS-PAGE است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از خلیج فارس، در سه نوبت از عمق ۵۰ سانتی‌متری و از فاصله ۱۵۰ تا ۲۰۰ متر از ساحل انجام شد. نمونه‌ها درون در ظروف پلاستیکی قابل اتوکلاو استریل در مجاورت یخ خشک که دمای ۴ الی ۱۰ درجه سانتی‌گراد را

جدول ۱- توالی پرایمر جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

اندازه باند (bp)	توالی پرایمر (5' to 3')	پرایمر
متغیر	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	16 srRNA
۹۸۹	F: TACGGAATTCATACCTTCTCGCAACCCATC R: TTACAGGACAACGTCATCAGCTATCGG	ansA
۴۹۷	F: TTACCCAATATCACCATTTTAG R: TTAGTACTGATTGAAGATCTG	ansB

میزان بیان ژن *ansA* و *ansB* با روش Real time PCR

برای استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV با غلظت 25 Iu/unit (شرکت Roche) صورت گرفت. واکنش Real time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس سایبرگرین (2X)، 5 میکرولیتر از آب دیونیزه، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA انجام شد. همچنین برنامه‌ی دمای سیکل‌های مختلف جهت تکثیر شامل: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه تنظیم گردید. از ژن خانگی بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (۱۷).

جداسازی ال آسپایناز کلون شده با استفاده از SDS-PAGE

سلول‌های کلون شده با استفاده از سانتریفیوژ دور $10000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری و سپس با ۲ میلی‌لیتر محلول لیز مخلوط شده و توسط ورتکس لیز گردید. سوسپانسیون به دست آمده در دور $13000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی داخل به ستون Ni-NTA با ۱ میلی‌لیتر رزین ریخته شد. ستون با بافر شستشو چندین بار شسته و بخش‌های شسته شده در بافر SDS-PAGE 1X حل گردید و در آب جوش به مدت ۳ دقیقه لیز شد. سلول‌ها در دور $4000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محصولات را در ژل ۱/۵٪ در TBE بافر به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ الکتروفورز گردید. برای رنگ‌آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس نتایج توسط دستگاه Geldocument مشاهده شدند (۱۴، ۱۵).

کلونینگ: در این مطالعه به منظور کلونینگ سریع و مؤثرتر برای محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از روش TA-Cloning (کیت TA-Cloning از شرکت سینا ژن) استفاده شد. از باکتری *شریشیاکلی XL1blue* خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران استفاده گردید و از وکتور PTG19-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین قرار دارد استفاده شد. همچنین این وکتور دارای ژن LacZ به منظور غربالگری سفید/آبی، سایت پرایمر M13 برای PCR و توالی یابی و آنزیم محدودکننده BamH1 است. آنزیم DNATaq پلیمرز به انتهای مولکول دو رشته DNA یک باز آدنوزین اضافه می‌کند؛ بنابراین تمامی قطعات PCR در انتهای ۳' خود دارای باز آدنوزین بودند. استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ۳' خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می‌شود، سپس آنزیم T4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA موردنظر به وکتور خطی را محکم می‌کند. وکتور کلون شده با ژن *ans* به باکتری *شریشیاکلی XL1blue* با روش $CaCl_2$ ترانسفورم شد. تائید کلونینگ توسط تست غربالگری سفید/آبی، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر ژن *ans* و سکانس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (شرکت Bioneer) صورت گرفت (۱۶).

منفی، تست حرکت منفی، تست اندول منفی، تولید سولفید هیدروژن منفی، لایزین دکربوکسیلاز منفی، تست سیترات مثبت، هیدرولیز نشاسته متغیر، هیدرولیز کازئین مثبت، تست اکسیداز منفی و تست کاتالاز مثبت بودند. با استفاده از تست‌های فنوتیپی، از مجموع ۲۰ نمونه ۱۲ (۶۰٪) نمونه به‌عنوان *استرپتومایسس* شناسایی شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن 16 srRNA تمامی نمونه‌های جداسازی شده با تست‌های فنوتیپی را تأیید نمود (شکل ۱).

پس از کلون کردن ژن‌های *ansA* و *ansB* توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه‌های کلون شده جداسازی شدند. به‌منظور تأیید نتایج کلون DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج‌شده و توسط آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و درنهایت سکانس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز وجود ژن *ansA* و *ansB* در باکتری *شریشیاکلی* XL1blue تأیید شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی در سایت NCBI بلست (Blast) شد که id آن‌ها همراه با لینک دسترسی به نتایج بلست درج گردید (شکل ۲ و ۳).

برای شناسایی پروتئین‌های محلول و بیان پروتئین‌های هدف با استفاده از SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی گردید (۱۸).

آنالیز آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، اطلاعات مربوط به هرگونه باکتری وارد نرم‌افزار SPSS-22 شد و با استفاده از آزمون آماری Chi-square رابطه‌ی بین اطلاعات آنالیز گردید. سطح معناداری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

از غربالگری نمونه‌های آب دریا ارسالی به آزمایشگاه که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. از کلنی‌های مشکوک به *استرپتومایسس* رنگ‌آمیزی گرم انجام و از لحاظ وجود باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بررسی شدند. نمونه‌های *استرپتومایسس* از نظر تست وژروسکوئر منفی، تست متیل رد



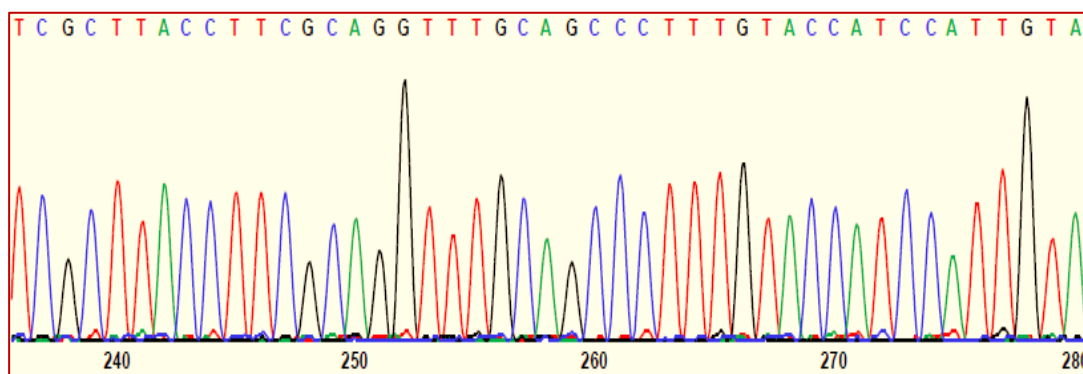
شکل ۱- نشان‌دهنده ژن 16 srRNA برای جنس *استرپتومایسس*، ۱: نشان‌دهنده جدایه *استرپتومایسس* +: نشان‌دهنده کنترل مثبت، -: نشان‌دهنده کنترل منفی و L: نشان‌دهنده لدر است.



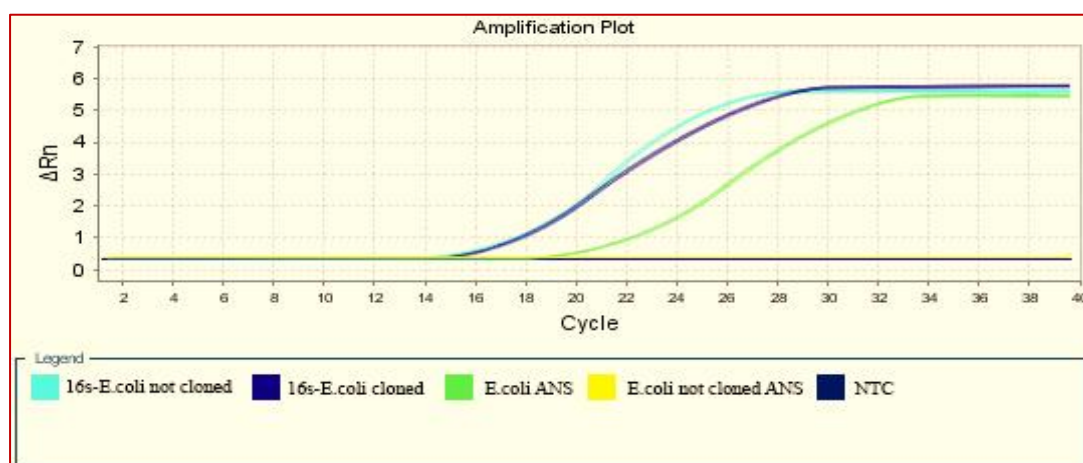
شکل ۲- نتایج کلون ژن‌های *ansA* و *ansB*

SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان صحیح پروتئین ال اسپاراژیناز در باکتری/شریشیاکلی XL1blue بود (شکل ۵).

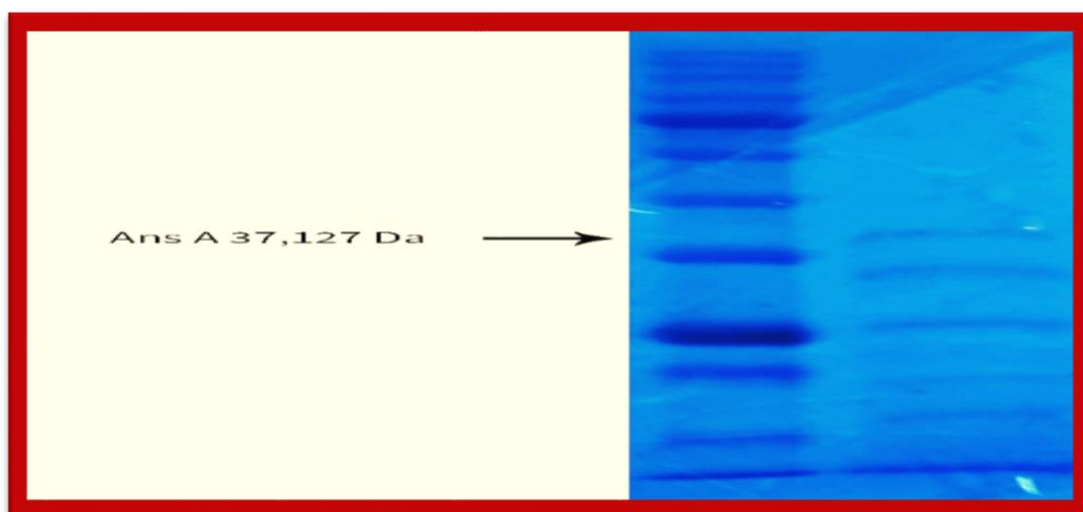
واکنش Real Time PCR برای ژن *Ans* و با استفاده از ژن مرجع 16S انجام شد (شکل ۴). درنهایت برای تأیید تولید پروتئین توسط ژن *Ans* از SDS-PAGE استفاده شد که نتایج



شکل ۳- تأیید کلونینگ توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای M13 و کتور با سکانس آن



شکل ۴- نمودار تکثیر Real Time PCR



شکل ۵- نتایج به‌دست‌آمده از SDS-PAGE تولید پروتئین ۳۷/۱۲۷ کیلودالتونی آنزیم ال اسپاراژیناز

بحث و نتیجه گیری

آنزیم *آسپاراژیناز* در پزشکی به عنوان دارویی مؤثر جهت درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد شناخته می شود. آنزیم های *آسپاراژیناز* که از میکروارگانیسم های مختلف به دست آمده است دارای خصوصیات درمانی و عوارض جانبی متفاوتی هستند. از این رو محققان جهت دستیابی به آنزیم های مطلوب تر، علاوه بر بهبود آنزیم های موجود با روش هایی همچون مهندسی پروتئین، به جستجو برای یافتن میکروارگانیسم های مختلف تولیدکننده این آنزیم نیز پرداخته و در این مسیر به نتایج ارزشمندی دست یافته اند.

در این پژوهش باکتری *استرپتومایسس* از خلیج فارس جداسازی گردید، تعیین هویت شد و سپس با روش PCR ژن آل-آسپاراژیناز I و II (*ansA*, *ansB*) در این باکتری ها شناسایی گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به داخل وکتور pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نو ترکیب با روش $CaCl_2$ به باکتری *شریشیاکلی* XL1blue ترانسفورم شد. باکتری *شریشیاکلی* ژن آنزیم *آسپاراژیناز* را بیان نمود و توانست آنزیم *آسپاراژیناز* را تولید نماید. تحقیقات مختلفی در زمینه تولید آنزیم *آسپاراژیناز* انجام شده که در مطالعه ارزانیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ اثر داروی آل *آسپاراژیناز* با دوز ۶۰۰۰ بر کودکان مبتلا به لوکمی لنفوبلاستیک حاد مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی DNA ژنومی به منظور تکثیر و کلون سازی ژن آل-آسپاراژیناز، استخراج و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن *آسپاراژیناز* انجام گردید. محصول PCR، پس از اتصال به وکتور، به باکتری *شریشیاکلی* BL21 منتقل گشت، پروتئین نو ترکیب حاصل با روش SDS-PAGE، آنالیز و فعالیت *آسپاراژیناز* سلول های ترانسفورم شده، با تست نسلر اندازه گیری شد. مقایسه توالی ژن کلون شده با توالی های موجود در بانک ژن با کمک نرم افزار BLAST، نشان داد که دارای بیشترین شباهت موجود بیش از ۹۹٪ با توالی های ثبت شده از برخی سویه های باکتری *شریشیاکلی* BL21 بودند. سلول های ترانسفورم شده پروتئین نو ترکیب را تولید کردند و نیز دارای فعالیت *آسپاراژیناز* بالایی بودند (۱۳). ناظمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی جداسازی و شناسایی مولکولی *باسیلوس* های تولیدکننده آنزیم آل-آسپاراژیناز خارج سلولی از خاک پرداختند و نشان دادند که آنزیم *آسپاراژیناز* نقش مهمی در درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد ایفا می کند. هدف این تحقیق، جستجو و معرفی

آنزیم های آل-آسپاراژیناز خارج سلولی تولید شده توسط جنس *باسیلوس* بود که به طور بالقوه می توانند خصوصیات سرولوژیک مطلوب تر و عوارض جانبی کمتری نسبت به انواع تجاری رایج داشته باشند. کلنی های تولیدکننده آنزیم مورد نظر، بر اساس تغییر رنگ محیط متمایز گردیدند. سپس آنزیم تولید شده، خالص سازی گشته و میزان فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین وزن مولکولی آنزیم اندازه گیری شد. *باسیلوس* های تولیدکننده آنزیم دارای فعالیت مطلوب، با روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه های جدید *باسیلوس* تولیدکننده آنزیم آل-آسپاراژیناز شناسایی شدند و خصوصیات کلی آنزیم های استخراجی مطالعه گردید. از آنجاکه آل-آسپاراژیناز جدا شده از باکتری های مختلف دارای اثرات ضد سرطانی متفاوتی بوده است، جستجو برای یافتن میکروارگانیسم های تولیدکننده این آنزیم، یکی از راه های اصلی جهت دستیابی به آنزیمی با خصوصیات درمانی ایده آل است (۱۹). نتایج تحقیقات همانند نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بیانگر این موضوع هستند که باکتری ها میکروارگانیسم های مناسبی جهت تولید آنزیم *آسپاراژیناز* می باشند.

در مطالعه ای دیگر که توسط ایزدپناه و همکاران صورت گرفت این محققین به دنبال سویه های جدید *باسیلوس* جهت ارزیابی وجود آنزیم آل *آسپاراژیناز* بودند. این محققین سویه جدیدی از *باسیلوس* به نام *باسیلوس* PG02 با تولید میزان بالای آنزیم آل *آسپاراژیناز* معرفی نمودند. همچنین با استفاده از کروماتوگرافی و SDS-PAGE نشان دادند که این آل *آسپاراژیناز* ها دارای وزن مولکولی ۳۸ kDa بودند و این آنزیم ها در pH= ۵-۱۰ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد فعال بودند. نتایج این تحقیق همانند نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که گونه های *باسیلوس* همانند گونه های *استرپتومایسس* منابعی ارزشمند جهت جداسازی آنزیم های جدید آل *آسپاراژیناز* می باشند (۲۰).

همچنین محبوبی و همکاران کلونینگ و بیان آنزیم آل *آسپاراژیناز* را در *شریشیاکلی* مورد بررسی قرار دادند. این محققین آنزیم ژن آل *آسپاراژیناز* را از *شریشیاکلی* K1 جداسازی نمودند و به وکتور pET32 وارد نمودند. سپس این وکتور با استفاده از روش شوک حرارتی به باکتری *شریشیاکلی* اوراگامی ترانسفر شد. در نتیجه با استفاده از سکانس و روش های روتین بیان این ژن را در باکتری سنجیدند و به این نتیجه دست یافتند که این آنزیم بیان بالایی در *شریشیاکلی* اوراگامی داشت. این محققین

جداسازی کردند و در باکتری/شریشیالکی BL21 کلون نمودند. تأیید تولید این آنزیم ال آسپاراژیناز جدید با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد که نشان داده شد این آنزیم دارای وزن مولکولی ۳۵ kDa است. همچنین pH نرمال جهت تولید این آنزیم را ۷/۵ اعلام نمودند (۲۳). نتایج به دست آمده از این مطالعه مشخص نمود که میکروارگانیسیم‌ها منبع ارزشمندی از تولید ال آسپاراژینازهای جدید می‌باشند و همانند نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر جداسازی این آنزیم و کلون در باکتری/شریشیالکی می‌تواند منجر به تولید انبوه آن‌ها شود.

تولید آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز جدید با کارایی بیشتر و اثرات جانبی کمتر به صورت تجاری می‌تواند در درمان لوکمی لنفوبلاستیک کودکان انقلابی بزرگ پدید آورد. آنزیم آسپاراژیناز از منابع مختلفی از جمله میکروارگانیسیم‌ها جدا گردیده است که این آنزیم دارای فعالیت ضد توموری می‌باشند؛ بنابراین پیدا کردن سویه‌های باکتریایی جدید تولیدکننده آنزیم ال آسپاراژیناز و استفاده تکنیک مهندسی ژن می‌تواند منجر به عملکرد بهتر این آنزیم‌ها شود و به وسیله آن گام بزرگی در مسیر افزایش و سهولت تولید ال آسپاراژیناز در صنعت داروسازی برداشت.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه برای حمایت از این طرح با کد پایان نامه ۲۲۵۳۰۵۲۸۹۷۲۰۰۶ نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

تعارض منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

با توجه به بیان بالای آنزیم ال آسپاراژیناز توسط/شریشیالکی/اورگانی نوترکیب، آن را یک گزینه مناسب جهت تولید انبوه آنزیم ال آسپاراژیناز در صنعت معرفی نمودند (۲۱). نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج به دست آمده از این مطالعه دارای مطابقت بود و نشان داده شده که/شریشیالکی/میکروارگانیسیم مناسبی جهت تولید آنزیم ال آسپاراژیناز است. در مطالعه‌ای دیگر که در هند انجام شد Amena و همکاران به بررسی تولید، خالص سازی و خصوصیات ال آسپاراژیناز توسط/استرپتومایسس گولبارجنسس پرداختند. این محققین آنزیم ال آسپاراژیناز را به عنوان یک عامل ضد لوسمی لنفوبلاستی حاد معرفی نمودند. در این مطالعه نتایج نشان داد که/استرپتومایسس گولبارجنسس توانایی تولید آنزیم ال آسپاراژیناز را دارا است و بهترین رنج pH جهت تولید این آنزیم برابر با ۸/۵ و مناسب ترین دما برای تولید این آنزیم دمای ۴۰ درجه سانتی گراد معرفی شد. از طرفی با استفاده از SDS-PAGE تولید این آنزیم مشخص شد و وزن مولکولی این آنزیم ۸۵ kDa گزارش شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه همانند نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر اثبات کننده این موضوع است که گونه‌های مختلف/استرپتومایسس توانایی تولید آنزیم ال آسپاراژیناز را دارا می‌باشند (۲۲). در سال ۲۰۱۶ Kebeish و همکاران به بررسی کلونینگ مولکولی، خصوصیات بیوشیمیایی و خاصیت ضد توموری یک ال آسپاراژیناز جدید در یک گونه سیانوباکتر به نام سینکوکوکوس/لونگاتوس پرداختند. این محققین متوجه این امر شدند که این گونه سیانوباکتر توانایی تولید آنزیم ال آسپاراژیناز را دارا است. سپس ژن آنزیم ال آسپاراژیناز را از این سیانوباکتر

References

1. Khat tab AI, Babiker EH, Saeed HA. Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. International Current Pharmaceutical Journal. 2016;5(3):27-32.
2. Errakhi R, Bouteau F, Barakate M, Lebrihi A, Compant S, Mathieu F. Isolation and characterization of antibiotics produced by Streptomyces J-2 and their role in biocontrol of plant diseases, especially grey mould. Biocontrol of Major Grapevine Diseases. 2016; 11(4):76-83.
3. Ye X, Anjum K, Song T, Wang W, Liang Y, Chen M, et al. Antiproliferative cyclodepsipeptides from the marine actinomycete Streptomyces sp. P11-23B downregulating the tumor metabolic enzymes of glycolysis, glutaminolysis, and lipogenesis. Phytochemistry. 2017;135:151-9.
4. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 2016;6(2):174.

5. Asthana N, Azmi W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*. 2003; 2(2): 184-194.
6. Pui C-H. Acute lymphoblastic leukemia: Springer. *New Directions in Cancer Treatment*. 2011; 4(3): 546-551.
7. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 2017;7(6):e577.
8. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer*. 2011;117(2):238-49.
9. Sivasankar P, Sugesh S, Vijayan P, Sivakumar K, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T, et al. Efficient production of L-asparaginase by marine *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal, India. *African Journal of Microbiology Research*. 2013;7(31):4015-21.
10. Ghoshoon MB, Raei MJ. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. *Am J Biochem Biotechnol*. 2008;4(4):422-4.
11. Meena B, Anburajan L, Sathish T, Raghavan RV, Dharani G, Vinithkumar NV, et al. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene. *Scientific reports*. 2015;5:12404.
12. Métayer LE, Brown RD, Carlebur S, Burke GA, Brown GC. Mechanisms of cell death induced by arginase and asparaginase in precursor B-cell lymphoblasts. *Apoptosis*. 2019;24(1-2):145-56.
13. Alijani H. Diversity and antimicrobial activities of streptomyces isolated from intertidal sediments of Deylam, Iran. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2017;24(9):22-31. [In persian]
14. Moradi M, Norouzi A, Taatimoghadam M. Prevalence of bla-CTX-M, bla-SHV, and bla-TEM Genes and Comparison of Antibiotic Resistance Pattern in Extended-spectrum β -lactamase producing and non-producing groups of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in Kerman Hospitals. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2016;6(1):120-8. [In persian]
15. Hadizadeh M, Norouzi A, Taghadosi R, Mohebi S, Mohammadi M, Hasanzade A, et al. Prevalence of qnr, intI, and intII genes in extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Iran. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;16(1):141-7.
16. Motohashi K. A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Scientific reports*. 2019;9(1):6417.
17. Shariati A, Asadian E, Fallah F, Azimi T, Hashemi A, Sharahi JY, et al. Evaluation of Nano-curcumin effects on expression levels of virulence genes and biofilm production of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. *Infection and drug resistance*. 2019;12:2223.
18. Meena B, Anburajan L, Vinithkumar NV, Shridhar D, Raghavan RV, Dharani G, et al. Molecular expression of l-asparaginase gene from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. *Gene*. 2016;590(2):220-6.
19. Nazemi A, Miri Nargesi M. Isolation and molecular identification of *Bacillus* species that produce extracellular L asparaginase, an anti-cancer enzyme, from soils. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2013;3(11):9-13.
20. Izadpanah Qeshmi F, Rahimzadeh M, Javadpour S, Poodat M. Intracellular L-Asparaginase from *Bacillus* sp. PG02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Optimum pH and Temperature. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2015; 2(6):155-160.
21. Mahboudi H, Abachi M, Araghi S, Hamedifar H, Vaziri B, Mahboudi F. Cloning and Cytoplasmic Expression of L-Asparaginase II in *E. coli*. *journal of microbial world summer*. 2010;2 (7):87-93.
22. Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar M, Dayanand A, Lingappa K. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian journal of Microbiology*. 2010;41(1):173-8.
23. Kebeish R, El-Sayed A, Fahmy H, Abdel-Ghany A. Molecular cloning, biochemical characterization, and antitumor properties of a novel L-asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(10):1173-81.



Original Article

Isolation and Purification of L-Asparaginase from Persian Gulf Streptomyces Isolates and Evaluation of It's Cloned Gene Expression in Escherichia Coli by Real-Time and SDS-PAGE

Soofer H¹, Amini K^{2*}, Shushtarian SMM³

1. Department of Biochemistry, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic azad university, Saveh, Iran

3. Department of Biophysics & Biochemistry, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 02 May 2020

Accepted: 21 Jul 2020

Abstract

Background & Objective: Asparaginase enzymes are effective in treating lymphoblastic leukemia cancer. This enzyme is isolated from bacterial sources and commercially available as an anticancer drug. The aim of this study was to isolate and purify L-asparaginase from Persian Gulf Streptomyces isolates and evaluate its cloned gene expression in E. coli by Real-Time and SDS-PAGE.

Materials & methods: Streptomyces isolates were isolated from the Persian Gulf and identified by biochemical tests, then, L-asparaginase genes were isolated from streptomyces by PCR method. The amplified fragment was entered into vector pTG19 by the TA cloning technique. In the next step, the recombinant vector was transformed into E. coli using CaCl₂ method and cloning confirmation using conventional methods.

Result: The results of this study showed that Streptomyces isolates from the Persian Gulf were capable of producing L-asparaginase. Eventually, the gene of this enzyme was successfully transformed to E. coli by vector and produced high efficiency L-asparaginase.

Conclusion: Finding new bacterial strains producing L-asparaginase and using gene engineering techniques can lead to better performance of these enzymes, thereby taking a big step in the direction of increasing and facilitating the production of L-asparaginase in the pharmaceutical industry.

Keywords: L-Asparaginase, Streptomyces, Lymphoblastic Leukemia

*Corresponding Author: Amini Kumars, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic azad university, Saveh, Iran

Email: dr_kumarss-amini@yahoo.com.

<https://orcid.org/0000-0002-6419-3417>