Archive of SID

غربالگری سویه های باکتری اشرشیاکلی جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز II

مریم قانع [*،۱]، بیژن بمبئی [۲]، مژگان قانع [۳]

۱. استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر

۲. استادیار بیولوژی مولکولی، گروه صنایع تخمیری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۳. کارشناس ارشد شیمی کاربردی، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر

***مسؤول مکاتبات**: دکتر مریم قانع، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، تلفن ۰۲۲۸۲۳۶۲۳۵۴، صندوق پستی ۳۶۹ /۳۳۱۳۵، پست الکترونیکی: maryamghaneh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت:۱۳۸۸/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۲۳

چکیده

آنزیم ال آسپاراژیناز II باکتری اشرشیاکولی دارای اثرات آنتی‌لوکمیا بوده و در حال حاضر به عنوان دارو در درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد به کار می‌رود. در این تحقیق، چهار سویه باکتری *E. coli* شامل TOPTEN، K12، LAB و DH5α از جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز II مورد آزمایش قرار گرفتند. با استفاده از روش PCR، سویه‌ها برای اثبات وجود ژن آسپاراژیناز II (*ansB*) غربالگری شدند. برای بررسی بیان آنزیم، سویه‌ها کشت داده شدند و زمانی که جذب نوری در ۶۰۰nm به یک رسید، القای بی‌هوازی صورت گرفت. پس از القا، سلول‌ها رسوب داده شد و محیط کشت فاقد سلول و محتویات پریپلاسمی سلول جهت بررسی تولید آسپاراژیناز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور سنجش فعالیت آنزیمی، از روش سنجش میزان آمونیاک تولید شده استفاده شد. نتایج PCR، وجود ژن *ans B* را در سویه‌های K12 و LAB و DH5α اثبات نمود. در همه سویه‌های فوق در شرایط هوازی، عصاره پریپلاسمی و نیز محلول رویی، فاقد فعالیت آسپاراژینازی بودند. میزان آمونیاک تولید شده در عصاره پریپلاسمی هر سه سویه در شرایط بی‌هوازی تقریبا یکسان و ۰/۰۱ µmol، و فعالیت آنزیمی به دست آمده، معادل ۳/۶ unit/ml بود. حداکثر میزان آنزیم تولید شده در باکتری *E. coli* LAB ۴۰ دقیقه و در *E. coli* K12 و *E. coli* DH5 α، یک ساعت پس از ایجاد شرایط بی‌هوازی بود و پس از آن میزان تولید بتدریج کاهش می‌یافت، به طوری که پس از گذشت سه ساعت به ۲/۵-۲ unit/ml رسید.

واژه‌های کلیدی: آسپاراژیناز II ، سنجش آنزیمی، *اشرشیا کلی*، *ansB*

مقدمه

آنزیم آسپاراژیناز، واکنش هیدرولیز اسیدآمینه آسپاراژین به اسیدآسپارتیک و آمونیاک را کاتالیز می‌کند. سوبسترا و محصول این آنزیم هر دو نقش‌های 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 می‌شود، احتمالا در کنترل سیستم بافری مایعات بدن نیز نقش دارد. با این حال، علاقه محققین به بررسی و مطالعه این آنزیم دلایل دیگری دارد که بیشتر به نقش این آنزیم در درمان سرطان خون برمی‌گردد. در سال ۱۹۵۳، Kidd و همکاران نشان دادند که سرم

www.SID.ir

Archive of SID

خوکچه هندی دارای خاصیت ضد توموری است که این خاصیت، مربوط به آنزیم آسپاراژیناز است (۱). Broome نشان داد که خاصیت ضد توموری سرم خوکچه به دلیل آنزیم ال آسپاراژیناز است (۲). بعدها مشخص شد که سرم خوکچه هندی دارای دو نوع آسپاراژیناز است (۳). جالب این که در میان پستانداران، تنها سرم خوکچه هندی دارای فعالیت قابل توجه ضد توموری است. Mashburn و Wriston نشان دادند برخی از سویه‌های اشرشیاکولی فعالیت آسپاراژینازی از خود نشان داده و ال‌آسپاراژیناز خالص شده از *E.coli*، مشابه سرم خوکچه، دارای خواص ضد توموری است (۴). اگرچه آنزیم آسپاراژیناز از منابع متعددی مانند باکتری *Proteus vulgaris* (۵)، *Acinetobacter calcoaeticu* (۶)، *Mycobacterium bovis* (۷)، قارچ‌های رشته‌ای (۸) و *Yersinia pseudocola* (۹) جدا گردیده است، اما در حال حاضر آسپاراژیناز تولید شده توسط *E.coli* برای درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد به کار می‌رود (۱۰). تحقیقات نشان داده که باکتری اشرشیاکولی حداقل دارای دو آنزیم با فعالیت آسپاراژینازی است (۱۰). ال‌آسپاراژیناز نوع I (*ansA*) سیتوپلاسمی بوده و میل ترکیبی پایینی برای آسپاراژین دارد؛ درحالی که نوع II (*ansB*) پریپلاسمی بوده و میل ترکیبی بالایی برای آسپاراژین دارد. ال‌آسپاراژیناز نوع II برخلاف نوع I در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود و خاصیت ضد توموری دارد (۱۱). در مورد سلول‌های سرطان خون مشاهده شده است که این سلول‌ها فاقد توانایی سنتز اسیدآمینه آسپاراژین در درون سیتوپلاسم خود هستند. از این رو، این سلول‌ها جهت سنتز پروتئین‌ها می‌بایست آسپاراژین مورد نیاز خود را از سرم تامین نمایند. در مقابل، سلول‌های طبیعی، قادر به سنتز آسپاراژین در سیتوپلاسم خود هستند. دلیل استفاده از آسپاراژیناز در مبارزه با سرطان خون نیز همین تفاوت بنیادی بین سلول‌های سرطانی و طبیعی است. هنگام تزریق آسپاراژیناز، میزان آسپاراژین سرم، کاهش یافته و سلول‌های سرطانی در شرایط فقر آسپاراژین قرارمی‌گیرند و رشد آنها متوقف شده و یا حتی منجر به مرگ آن‌ها می‌شود. در همین راستا در رژیم درمانی علیه سرطان خون، آسپاراژیناز نیز در کنار شیمی درمانی تجویز می‌گردد (۸،۱۲،۱۳).

نظر به اهمیت آنزیم آسپاراژیناز در درمان بیماران مبتلا به سرطان خون، یافتن سویه‌هایی که توانایی تولید مقدار بالایی از آنزیم را دارند می‌تواند افق‌های تازه‌ای را برای تولید این آنزیم در داخل کشور باز کند. دلیل این امر نیز آن است که همیشه برای تولید صنعتی و حتی نیمه صنعتی آنزیم‌های صنعتی و دارویی، نیاز به کلون‌هایی است که قادر به تولید آنزیم مورد نظر در حد مطلوب باشند. در این تحقیق، سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* از لحاظ میزان تولید آنزیم ال‌آسپاراژیناز II مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

باکتری *E. coli* شامل سویه‌های DH5α، LAB، TOP10 و K12 از پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای غربالگری استفاده شدند.

غربالگری سویه‌های تولیدکننده آسپاراژیناز با استفاده از روش PCR

برای غربالگری، هر یک از سویه‌ها در محیط مغذی (Yeast Extract Luria Bertani (LB 5g، Pepton 10g، NaCl 10g، Agar 16g، dH2O 1 lit) کشت شد. پس از رشد و جداسازی سلول‌ها از محیط کشت، DNA کامل باکتری‌ها توسط کیت استخراج DNA ژنومیک (Roche, Germany) و با دستورالعمل شرکت سازنده خالص گردید. واکنش PCR مطابق با روش‌های استاندارد (۱۴) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و برنامه زمانی ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۴°C به مدت ۹۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه (۳۰ سیکل)،

www.SID.ir

Archive of SID

۷۵°C به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل) صورت گرفت. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (Merk, Germany) الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه Geldoc (Uvitec England) مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

ansB-F11: 5′CACGTAAGCTTGAGGAATCATATGG
ansB-R1: 5′ CCGAGCTCGGTACCCGGGCAAGG

کشت باکتری‌ها جهت بررسی میزان آسپاراژیناز

یک کلنی تک از هر یک از سویه‌های باکتری *E. coli* که از لحاظ ژن آسپاراژیناز II مثبت بودند، در محیط M9 تغییر یافته با ترکیب Na2HPO4 0.5g، KH2PO4 0.8g، NaCl 0.5g، L-asparagine 10g، Maltose 1g، dH2O 1lit با pH:7 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 یک ساعت جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰nm به یک رسید (فاز لگاریتمی)، برای القای بی‌هوازی، فلاسک از انکوباتور شیکردار خارج شد و در حالت سکون در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد و به مدت ۳ ساعت در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه، نمونه‌گیری انجام گرفت و میزان فعالیت آسپاراژینازی عصاره پریپلاسمی باکتری‌ها و نیز محلول رویی (محیط کشت بدون باکتری) قبل و پس از القای بی‌هوازی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، 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. محلول رویی برای بررسی آسپاراژیناز ترشح شده به خارج سلول و رسوب سلول‌های باکتری برای جداسازی محتویات پریپلاسمی استفاده شد. رسوب سلول‌های باکتری در بافر Tris-EDTA-Sucrose (TES) سرد با ترکیب Tris-HCl 0.2M، pH: 8 0.5mM EDTA، Sucrose 0.5M 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 ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی محتویات پریپلاسمی باکتری است از سلول‌های باکتری جدا شد. این محلول جهت سنجش فعالیت آنزیمی و الکتروفورز پروتئین، مورداستفاده قرار گرفت. برای الکتروفورز پروتئین به ازای هر میلی‌لیتر مایع رویی مرحله قبل، ۱۲۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) صد در صد اضافه شده و پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C، رسوب مطابق روش استاندارد (۱۴) توسط SDS-PAGE بررسی شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

مطابق جدول ۱، هر یک از محلول‌های A، B و C تهیه شد. پنج لوله انتخاب و به هر کدام از لوله‌های نمونه، شاهد و استانداردها مطابق جدول، مقادیر مورد نیاز اضافه گردید. لوله‌های استاندارد، حاوی غلظت‌های متفاوتی از سوبسترای استاندارد و نیز شاهد استاندارد بوده و برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. لوله نمونه، حاوی اسیدآمینه آسپاراژین بوده و در صورت تولید آسپاراژیناز توسط باکتری‌های مورد آزمایش، آمونیاک تولید شده به وسیله معرف نسلر قابل ارزیابی خواهد بود. پس از افزودن مقادیر لازم مطابق جدول، تمامی لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷°C

www.SID.ir

Archive of SID

گرماگذاری شدند. صد میکرولیتر از محتویات پریپلاسمی باکتری‌ها و یا محیط کشت بدون سلول که حاوی آنزیم بوده و در مرحله قبل به دست آمده بودند، به لوله نمونه اضافه شد و به سرعت مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ^{o}C ۳۷ گرماگذاری شد. از آن جا که این لوله حاوی آسپاراژین است، در صورت وجود آسپاراژیناز در نمونه مجهول آمونیاک تولید خواهد شد. به تمام لوله‌های فوق ۱۰۰ میکرولیتر محلول TCA 1.5M به عنوان خاتمه دهنده واکنش، اضافه و بلافاصله به وسیله همزن، یکنواخت گردید، تا آنزیم، غیرفعال شود. به نمونه شاهد نیز ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مجهول حاوی آنزیم اضافه شد و بلافاصله به وسیله همزن، یکنواخت گردید. تمامی لوله‌ها در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی هر یک از نمونه‌ها برای مراحل بعد استفاده شد. در مرحله بعد، ابتدا در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ۴/۳ میلی‌لیتر آب مقطر وسپس ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی مرحله ۱ و در نهایت ۵۰۰ میکرولیتر معرف نسلر (Sigma) اضافه و مخلوط گردید. پس از نگهداری محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۱ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Genway, (England) جذب هر یک از لوله‌های شاهد استانداردها و نمونه در طول موج ۴۳۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. از آن جایی که یک واحد آنزیم آسپاراژیناز II، مقداری از آنزیم است که در مدت ۱ دقیقه در دمای $37^{o}C$، یک میکرومول آمونیاک را در محیط آزاد می‌سازد، با استفاده از جذب نوری (OD) به دست آمده از نمونه‌های استاندارد، منحنی استاندارد برای غلظت‌های ۰/۲۷، ۱/۰۰۸/۵۴ میکرومولار آمونیوم سولفات با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد. سپس جذب نوری (OD) به دست آمده توسط هر یک از سویه‌های مختلف در معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد قرار داده شد و میزان آمونیاک تولید شده در نمونه‌های مجهول بر حسب میکرومول محاسبه شد. در نهایت، برای تبدیل غلظت به واحد آنزیمی از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Enzyme activity (Unit/ml)} = \frac{(\mu\text{mol of NH3})(2.2)}{(0.2)(30)(0.1)}$$

۲/۲ = حجم کل نمونه در مرحله ۱ (بر حسب میلی‌لیتر)

۰/۲ = حجمی از مرحله ۱ که در مرحله ۲ استفاده شد (بر حسب میلی‌لیتر)

۳۰ = زمان آزمایش (بر حسب دقیقه)

۰/۱= حجم آنزیم استفاده شده (بر حسب میلی‌لیتر)

با توجه به این که از هر محلول پروتئینی، حجم کمی جهت سنجش، برداشت و رقیق گردید، مقدار کل واحد آنزیمی به دست آمده در ضریب رقت ، ضرب گردید.

جدول ۱ - مقادیر مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیم آسپاراژیناز.

لوله آزمایش / محلول مورد نیاز (میلی لیتر)	استاندارد				شاهد (Blank)	نمونه
	ST(Blank)	ST3	ST2	ST1		
A بافر تریس(50mM) (pH 8.6)	۱	۱	۱	۱	۱	۱
B L-asparagine (189mM)	-	-	-	-	۰/۱	۰/۱
C سوبسترای استاندارد (NH4)2SO4(6mM)	-	۱	۰/۵	۰/۲۵	-	-
آب مقطر	۱/۱	۰/۱	۰/۶	۰/۸۵	۰/۹	۰/۹

نتایج

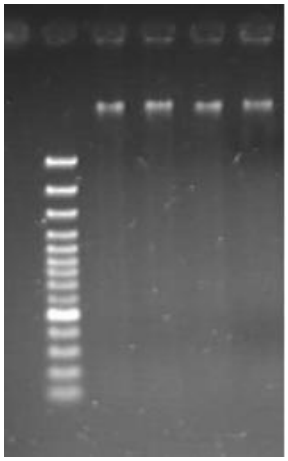
غربالگری سویه‌های *E. coli* برای تولید آسپاراژیناز

نتایج حاصل از استخراج ژنوم کامل باکتری‌های مورد آزمایش روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ و نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای

www.SID.ir

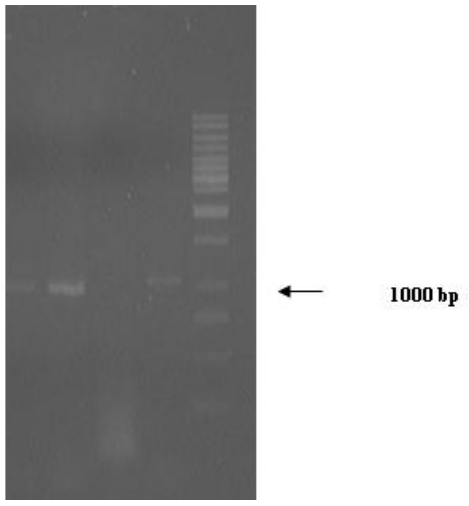
Archive of SID

اختصاصی طراحی شده برای ژن آسپاراژیناز، در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، سویه‌های DH5α، LAB و K12، حاوی ژن آسپاراژیناز هستند؛ چرا که با توجه به مارکر وزن مولکولی قطعه حدود ۱۰۴۷bp را که با اندازه ژن آسپاراژیناز مطابقت دارد (۱۵) نشان می‌دهد.



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

شکل ۱- الکتروفورز ژنوم کامل سویه‌های مختلف *E. coli* روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp؛ ستون‌های ۲ تا ۵ به ترتیب: ژنوم کامل سویه‌های DH5α، LAB، TOP10 و K12.

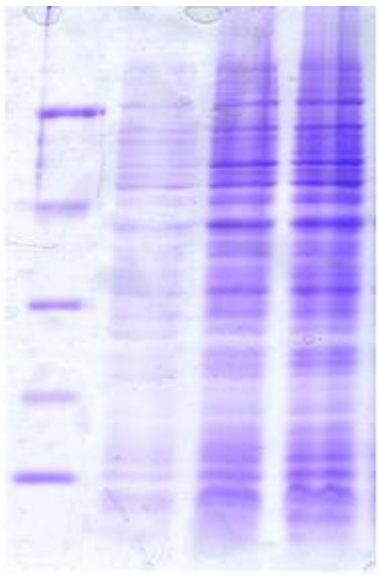


۱ ۲ ۳ ۴ ۵

شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR سویه‌های مختلف *E. coli* با پرایمرهای اختصاصی بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون‌های ۱ تا ۴ (از چپ به راست): به ترتیب محصول PCR سویه‌های DH5 α، LAB، TOP10 و K12؛ ستون ۵: مارکر وزن مولکولی ۱Kb.

تعیین فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز

شکل ۳، نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) عصاره پریپلاسمی باکتری‌ها در یک ساعت پس از القای بی‌هوازی را نشان می‌دهد که باند مشخصی بر روی ژل مشاهده نمی‌شود.



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

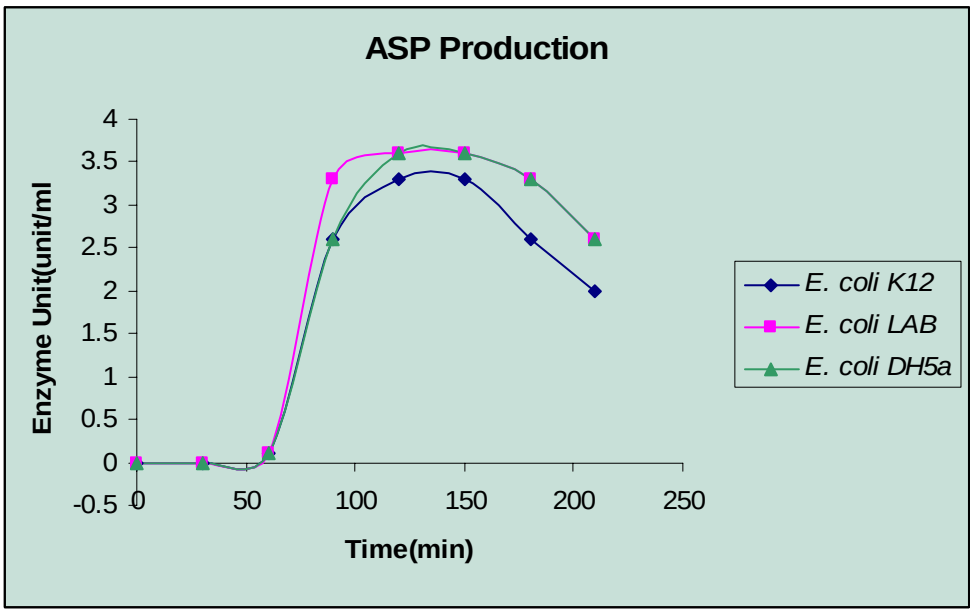
شکل ۳ - الکتروفورز عصاره پریپلاسمی سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* توسط ژل SDS-PAGE ۱۳درصد. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین؛ ستون‌های ۲ تا ۴ به ترتیب عصاره سویه‌های DH5α، LAB و K12.

جهت تعیین فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز II، از محتویات پریپلاسمی و نیز محیط کشت بدون باکتری استفاده شد. شکل ۴، نمودار تولید آسپاراژیناز بر حسب زمان را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در تمامی سویه‌های فوق، میزان بیان آسپاراژیناز در شرایط هوازی در حد صفر بوده و پس از ایجاد شرایط بی‌هوازی، فعالیت آنزیمی مشاهده می‌گردد. همچنین تمامی سویه‌ها در شرایط بی‌هوازی، فعالیت آسپاراژینازی داشته و از لحاظ تولید آنزیم تقریبا مشابه هستند. حداکثر میزان آنزیم تولید شده در باکتری *E. coli* LAB، ۴۰ دقیقه و در *E. coli* K12 و *E. coli* DH5α، ۱ ساعت پس از ایجاد شرایط بی‌هوازی و در انتهای فاز لگاریتمی بود. حد اکثر تولید آنزیم در سویه‌های *E. coli* LAB و *E. coli* DH5α به میزان

www.SID.ir

Archive of SID

۳/۶unit/ml و در *E. coli* K12 بـه میـزان ۳/۳unit/ml بود و پـس از گذشـت سـه سـاعت در سـویه‌هـای *E. coli* LAB و *E. coli*DH5α بـه ۲/۵unit/ml و در *E. coli* K12 بـه ۲ unit/ml کاهش می‌یافت.



شکل ۴- نمودار تولید آنزیم توسط باکتری‌های *E. coli* سویه DH5α، LAB و K12. پیکان، زمان القای بی‌هوازی را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف این پروژه، یـافتن سـویه یـا سـویه‌هـایی از بـاکتری اشرشـیاکولی بـود کـه دارای بیـان قابـل ملاحظه‌ای از آنزیم آسپاراژیناز باشـند. غربـالگری در سطح ژنتیکی با استفاده از تکنیک PCR، وجـود ژن آنـزیم مـذکور بـا ۱۰۴۷bpرا در حـداقل سـه سـویه DH5α،K12 و LAB نـشان داد کـه بـا مطالعـات انجام شده توسط Bonthron و Jenning مطابقت دارد (۱۶،۱۵). بنابراین، برای بررسـی بیـان آنـزیم، از سویه‌های فوق در آزمایش‌های بعدی استفاده شـد. از آن جایی که آنزیم آسپاراژیناز II حاوی پپتید نـشانه بوده و وارد فضای پریپلاسمی می‌شود (۳)، محتویات پریپلاسمی و نیز محیط کشت فاقـد بـاکتری جهـت بررسی آسپاراژیناز استفاده شد. مطالعات انجام شـده توسط Schwartz و همکاران نـشان داد کـه تولیـد آنزیم در محیط کشت تنها در صورت تغییر شرایط از حالت هوازی به بـی‌هـوازی امکـان‌پـذیر اسـت (۱۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر با نتـایج بدسـت آمـده توسـطSchwartz و همکـاران مطابقـت دارد؛ بـه طوری که میزان بیان آسـپاراژیناز در محـیط کـشت فاقد باکتری و عصاره پریپلاسمی سویه‌های *E. coli* مورد آزمایش در شرایط هـوازی در حـد صـفر بـود و تنها با القای بی‌هوازی بیان آنزیم صورت گرفت. دلیل این امر نیز مربوط به پروموتر ژن *ansB* اسـت. ایـن پروموتر در شرایط هوازی توسط مهارکننـده حـساس به اکسیژن غیرفعال است. در شرایط کمبود اکـسیژن این مهارکننده از پروموتر جدا شده و آنـزیم RNA polymerase می‌تواند ژن را رونویـسی کـرده و بـه کمک ریبوزوم‌ها منجـر بـه تولیـد پـروتئین شـود. از طرف دیگر، باکتری اشرشـیاکولی، هـوازی اختیـاری بوده و بهترین شرایط رشـد آن در حـالتی اسـت کـه اکسیژن محلـول در محـیط کـشت در حـد مناسـبی (هوادهی در شیکر حداقل ۲۰۰ دور در دقیقه) جهت تولید توده سلول باشـد (۱۱). ایـن امـر موجـب یـک تضاد درونی مـی‌گـردد. یعنـی تولیـد آنـزیم، شـرایط بی‌هوازی را می‌طلبد و تولید تـوده سـلولی، نیـاز بـه هوادهی دارد. یکی از راه‌حل‌های انجام شـده، کـشت

www.SID.ir

Archive of SID

دوفازی باکتری‌ها است. در این روش ابتدا باکتری در شرایط هوازی رشد داده می‌شود تا توده سلولی به میزان مناسبی برسد و سپس اقدام به القا و تغییر شرایط از هوازی به بی‌هوازی می‌شود تا آنزیم آسپاراژیناز بیان گردد (۱۱). در تحقیق حاضر نیز از روش فوق استفاده شد. حداکثر میزان آنزیم تولید شده در باکتری *E. coli* LAB، ۴۰ دقیقه و در *E. coli* K12 و *E. coli* DH5 α، یک ساعت پس از ایجاد شرایط بی‌هوازی بود. نتایج به دست آمده، با مطالعات انجام شده توسط Cedar مطابقت دارد. مطالعات انجام شده توسط Jennings نشان داده که میزان بیان ژن *ansB* تحت تاثیر عواملی چون منبع کربن و اسیدهای‌آمینه در دسترس است و استفاده از برخی مواد مانند آسپاراژین، باعث افزایش بیان آنزیم می‌شود (۱۸). همچنین گلوکز، یک مهارکننده برای بیان ژن *ansB* است (۱۹،۲۰). در این تحقیق به منظور بیان ژن *ansB* در محیط کشت این باکتری، از مالتوز به عنوان منبع کربن استفاده شد. فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز در عصاره پریپلاسمی سویه‌های مورد آزمایش در شرایط فوق با روش نسلر حداکثر ۳/۶ u/ml بوده و عدم تشکیل باند قابل مشاهده آسپاراژیناز در الکتروفورز پروتئین، به دلیل پایین بودن میزان بیان ژن است. این میزان در مقایسه با مطالعات انجام شده توسط Cedar (۵/۲ unit/ml) که در آزمایش‌های خود از آسپاراژین به عنوان منبع کربن و ازت استفاده نمود، کمتر است. البته استفاده از آسپاراژین، مقرون به صرفه نبوده و به همین دلیل در این تحقیق از آن استفاده نشد. حداکثر میزان تولید آنزیم مطابق نتایج به دست آمده توسط Cedar در یک ساعت نخست بوده و پس از آن، میزان تولید آنزیم به تدریج کاهش می‌یافت (۱۰). در این تحقیق نیز پس از گذشت ۳ ساعت، میزان تولید در سویه‌های مورد آزمایش ۲/۵unit/ml-۲ کاهش می‌یافت.

استفاده از آسپاراژیناز II در درمان بیماری‌های نئوپلاستیک، اهمیت تولید آن در مقیاس بالا را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد با توجه به پایین بودن میزان تولید این آنزیم در سویه‌های فوق، با بهینه‌سازی محیط کشت این باکتری‌ها بتوان میزان تولید را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از راهنمایی‌های جناب آقای دکتر بمبئی و سرکار خانم دکتر فاطمه تابنده در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری در طول انجام این پژوهش صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Kidd, J., 1953. Regration of transplanted lymphomas induced in vivo by means of pig serum. J Expect Medicine 98: 583-606.
2. 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 resensitive lymphoma cells. J Exptl Med 127: 1053-1080.
3. Browm, M. W., 1974. Isolation of two L-asparaginase from Guinea pig liver. Enzyme 17: 276-280.
4. Mashburn, L. T., Wriston, J, C., 1964. Tumor inhibition effect of L-asparaginase from *E. coli*. Arch Biochem Biophys 105: 450-452.
5. Lee, B., Yang, H., 1973. Crystalographic studies on L-asparaginase from *Proteus vulgaris*. J Biol Chem 248: 7620-7625.
6. Jones, P., Kristian, T., Einarsson, M., 1973. Purification and properties of L-asparaginase from acinetobacter calcoaeticus. Biochem Biophys Res Commun 48: 35-40.
7. Sorua, E., Teodorescu, M., Zaharia, O., 1972. L-asparaginase from the BCG strain of *Mycobacterium bovis*. Can J Biochem 50: 1149-1150.
8. Sarquis, M, I., Olivera, A., Santos, A., Costa, G., 2004. Production of L-asparaginase by filamentus fungi. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 489-492.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Abakumova, L., Podobed, O., 2008. Antitumor activity of L asparaginase from *Yersinia pseudoculosis*. Biomed Khim 54: 712-719.
10. Campbellet, H., Mashburn, L., Boys, E., 1967.Two L-asparaginase from *E. coli* their separation, purification and anti tumor activity. Biochem 6: 721-726.
11. Cedar, H., Schwartz, J, H., 1968. Production of L-Asparaginase II by *E. coli*. Journal of Bacteriology 96: 2043-2048.
12. Kozak, M., Jurgab, S., 2002. A comparison between the crystal and solution structures of *E. coli* asparaginase II. Acta Biochem Pol 49: 509-513.
13. Swain, L., Jaskolski, M., 1993. Crystal structure of L asparaginase. Pros Natl Acad Sci Usa 90: 1474-1478
14. Sambrok, J., Russell, D. W., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press) 450-475.
15. Jenning, M., Beacham, I. R., 1990. analysis of *E. coli* gene encoding *ansB.* J Bacteriol 172: 1491-1498.
16. Bonthron, D. T., 1990. L- asparaginase II of *E. coli*, cloning, mapping and sequencing of *ansB* gene. Gene 91: 101-105.
17. 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.
18. Jennings, M. P., Beachman, I. R., 1990. Analysis of the *E. Coli* gene encoding L-asparaginase II, *ansB* and its regulation by ciclic AMP receptor and FNR protein. J Bacteriol 172: 1491-1498.
19. Ghasemi, Y., Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Zarrini, G., Ghoshoon, M. B., 2008. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4: 422-424.
20. Turn, N., Trempy, J., 2004. Fundemental Bacterial Genetics. 1 st Edn. Published bu Blackwell publishing. Blackwell Science Ltd. pp:304.

www.SID.ir