مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال دهم | شماره ۳ | پاییز ۱۳۹۹

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

مقاله پژوهشی

جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های *استرپتومایسس* خلیج‌فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری *اشریشیاکلی* با Real-time و SDS-PAGE

حدیثه سوفر[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 دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم ال آسپارژیناز کاربرد مؤثر در درمان سرطان لوسمی لنفوبلاستیک دارد. این آنزیم از منابع باکتریایی جداشده و به‌صورت تجاری به‌عنوان داروی ضد سرطان عرضه می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های *استرپتومایسس* خلیج‌فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری *اشریشیاکلی* با Real-time و SDS-PAGE است.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های جنس *استرپتومایسس* از خلیج‌فارس جداسازی و توسط تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند و سپس با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن ال آسپاراژیناز از این *استرپتومایسس*ها 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 *اشریشیاکلی* ترانسفورم شد و با استفاده از روش‌های رایج تائید کلونینگ انجام گردید.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد که *استرپتومایسس*های جداشده از خلیج‌فارس قادر به تولید آنزیم ال آسپاراژیناز می‌باشند. درنهایت ژن این آنزیم توسط وکتور با موفقیت به باکتری *اشریشیاکلی* 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 به‌وسیله آن گام بزرگی در مسیر افزایش و سهولت تولید ال آسپاراژیناز در صنعت داروسازی برداشت.

کلمات کلیدی: ال-آسپاراژیناز، *استرپتومایسس*، لوکمی لنفوبلاستیک

مقدمه

گونه‌های *استرپتومایسس* باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و هوازی هستند که در خانواده اکتینومیست‌ها 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 واکنش‌های شیمیایی بشمار می‌روند. به‌کارگیری هدفمند آنزیم‌ها به‌منظور مداخله در سیر واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی همواره یکی از موضوعات موردتوجه در صنعت و پزشکی بوده است. ال آسپاراژیناز که اسیدآمینه ال آسپارژین را به دو جزء آسپارتیک اسید و آمونیاک می‌شکند ازجمله 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 استفاده‌شده است. در ایالات‌متحده سالانه ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد لوکمی لنفوبلاستیک حاد جدید بروز می‌کند که دوسوم از بیماران را کودکان تشکیل می‌دهند. مبتلایان به این

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

www.SID.ir

Archive of SID
جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

بیماری اغلب علائم خستگی، تب و خونریزی و درد استخوانی را داشته، لنفادنوپاتی منتشر، اسپلنومگالی و هپاتومگالی نیز از یافته‌های شایع بیماری است (۶، ۷). آنزیم ال آسپاراژیناز در پزشکی به‌عنوان دارویی مؤثر جهت درمان لوکمی لنفوبلاستی حاد سرطان خون شناخته می‌شود. این آنزیم، در مقایسه با سایر داروهای مورداستفاده در شیمی‌درمانی سازگاری بسیار بالایی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد. ازاین‌رو محققان در تلاش برای دستیابی به آنزیم آسپاراژیناز با توان درمانی بالا و عوارض جانبی کم می‌باشند (۸). جنس *استرپتومایسس* دریایی ازنظر تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های خارج سلولی بخصوص آنزیم ال آسپاراژیناز شاخص است. *استرپتومایسس* حداقل دارای دو آنزیم با فعالیت آسپاراژینازی است. ال آسپاراژیناز نوع I (*ansA*) سیتوپلاسمی بوده و میل ترکیبی پایینی برای آسپاراژین دارد؛ درحالی‌که 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 اسیدآمینه آسپاراژین در درون سیتوپلاسم خود ندارند. ازاین‌رو، این سلول‌ها جهت سنتز پروتئین‌ها می‌بایست آسپاراژین موردنیاز 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 رژیم‌درمانی علیه سرطان خون، آسپاراژیناز نیز در کنار شیمی‌درمانی تجویز می‌گردد (۱۲). با توجه به اینکه این دارو از مؤثرترین داروها در مرحله القائی و تشدیدی درمان لوکمی لنفوبلاستیک حاد است، هدف از این مطالعه جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز از جدایه‌های *استرپتومایسس* خلیج‌فارس و بررسی بیان ژن کلون شده آن در باکتری *اشریشیاکلی* با Real-time و SDS-PAGE است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از خلیج‌فارس، 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 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. درنهایت 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 پلیمراز: پس از تائید باکتری *استرپتومایسس* بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی جهت تائید نهایی جنس *استرپتومایسس* با استفاده از ژن 16 srRNA انجام گردید. به‌منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA (کیت ذخایر مرکز ژنتیک ایران) و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده و همچنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول ۱ ذکر گردیده است. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 پلیمراز 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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

جدول ۱- توالی پرایمر جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 به‌منظور کلونینگ سریع و مؤثرتر برای محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از روش TA-Cloning (کیت TA-Cloning از شرکت سینا ژن) استفاده شد. از باکتری *اشریشیاکلی* XL1blue خریداری‌شده 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 به‌منظور غربالگری سفید/آبی، سایت پرایمر M13 برای PCR و توالی یابی و آنزیم محدودکننده BamH1 است. آنزیم DNATaq پلیمراز 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 *اشریشیاکلی* XL1blue با روش $Cacl_2$ ترانسفورم شد. تائید کلونینگ توسط تست غربالگری سفید/آبی، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر ژن *ans* و سکانس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شرکت Bioneer) صورت گرفت (۱۶).

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 lμ/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 به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (۱۷).

جداسازی ال آسپاژیناز کلون شده با استفاده از SDS-PAGE

سلول‌های کلون شده با استفاده از سانتریفیوژ دور g × ۱۰۰۰۰ 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 به‌دست‌آمده در دور g × ۱۳۰۰۰ 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 g × ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

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

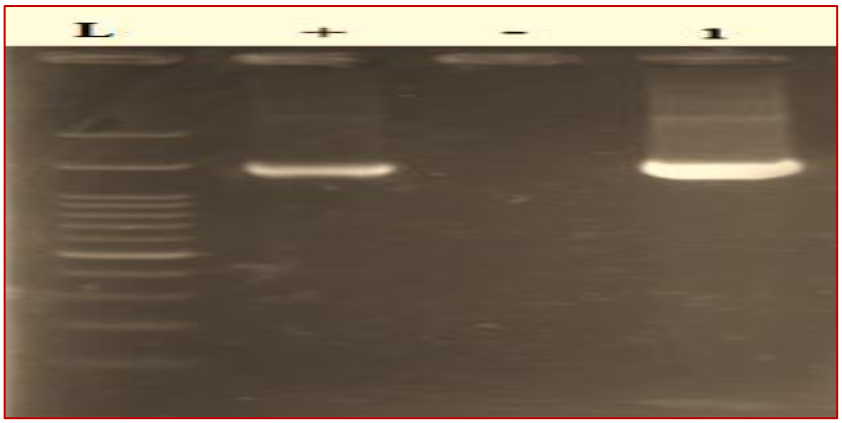
آنالیز آماری

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.

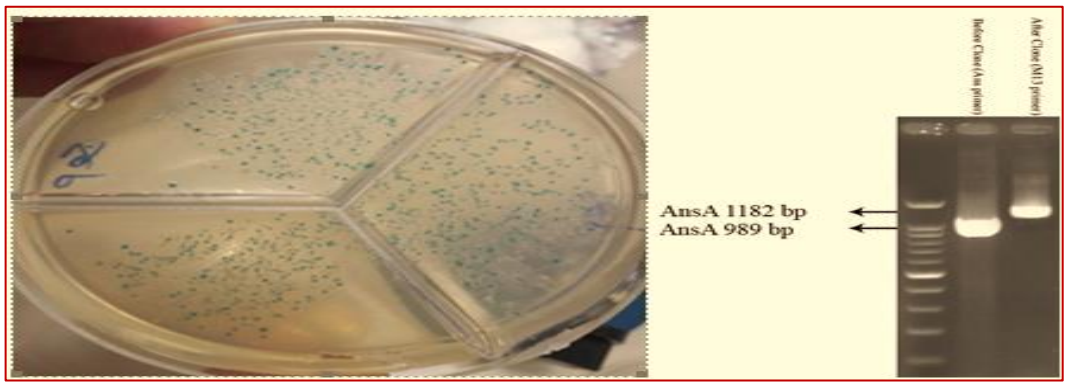
نتایج

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 ازلحاظ وجود باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بررسی شدند. نمونه‌های *استرپتومایسس* ازنظر تست وژپروسکوئر منفی، تست متیل رد 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 پلیمراز برای ژن 16 srRNA تمامی نمونه‌های جداسازی شده با تست‌های فنوتیپی را تائید نمود (شکل ۱).

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



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



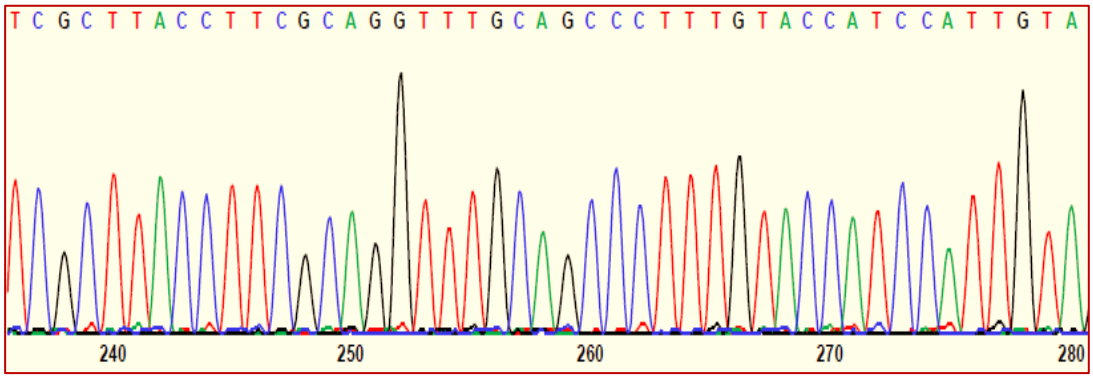
شکل ۲- نتایج کلون ژن‌های *ansA* و *ansB*

www.SID.ir

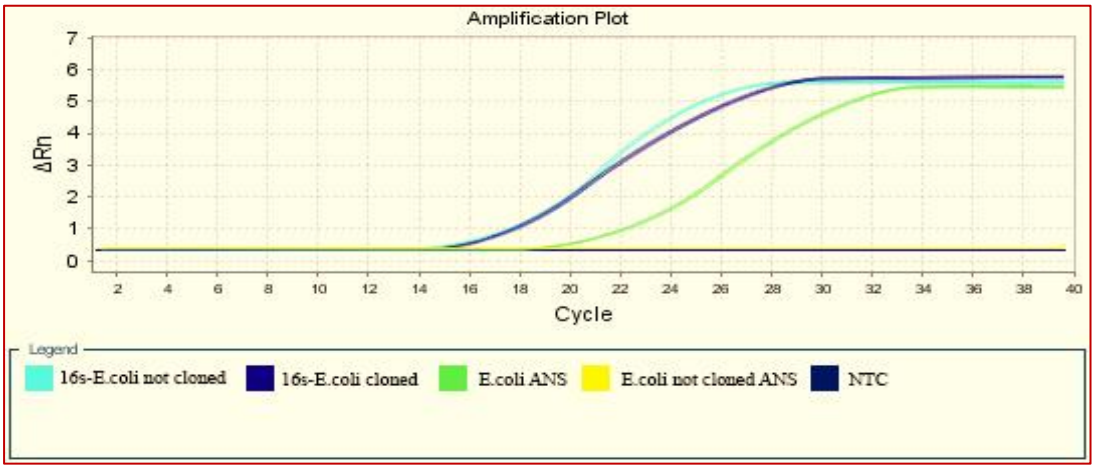
Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

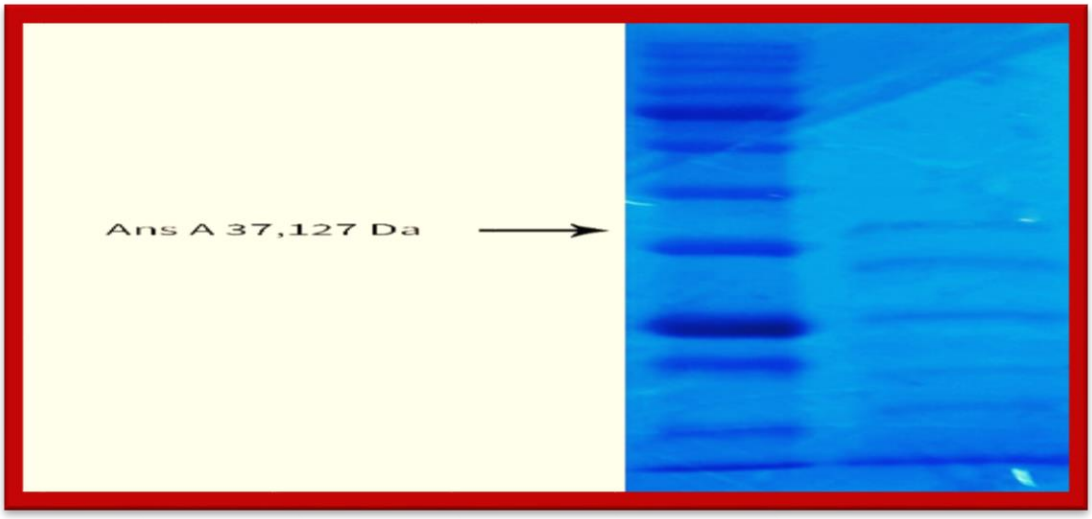
واکنش Real Time PCR برای ژن *Ans* و با استفاده از ژن مرجع 16S انجام شد (شکل ۴). درنهایت برای تائید تولید پروتئین توسط ژن *Ans* از SDS-PAGE استفاده شد که نتایج SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان صحیح پروتئین ال آسپاراژیناز در باکتری *اشریشیاکلی* XL1blue بود (شکل ۵).



شکل ۳- تائید کلونینگ توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای M13 وکتور با سکانس آن



شکل ۴- نمودار تکثیر Real Time PCR



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

www.SID.ir
journal.fums.ac.ir

Archive of SID
جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم *آسپاراژیناز* در پزشکی به‌عنوان دارویی مؤثر جهت درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد شناخته می‌شود. آنزیم‌های آسپاراژیناز که از میکروارگانیسم‌های مختلف به‌دست‌آمده است دارای خصوصیات درمانی و عوارض جانبی متفاوتی هستند. ازاین‌رو محققان جهت دستیابی به آنزیم‌های مطلوب‌تر، علاوه بر بهبود آنزیم‌های موجود با روش‌هایی همچون مهندسی پروتئین، به جستجو برای یافتن میکروارگانیسم‌های مختلف تولیدکننده این آنزیم نیز پرداخته و در این مسیر به نتایج ارزشمندی دست‌یافته‌اند.

در این پژوهش باکتری *استرپتومایسس* از خلیج‌فارس جداسازی گردید، تعیین هویت شد و سپس با روش PCR ژن ال-آسپاراژیناز I و II (*ansA, ansB*) در این باکتری‌ها شناسایی گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به داخل وکتور pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نوترکیب با روش $CaCl_2$ به باکتری *اشریشیاکلی* XL1blue ترانسفورم شد. باکتری *اشرشیاکلی* ژن آنزیم آسپاراژیناز را بیان نمود و توانست آنزیم آسپاراژیناز را تولید نماید. تحقیقات مختلفی درزمینهٔ تولید آنزیم آسپاراژیناز انجام‌شده که در مطالعه ارزانیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ اثر داروی ال آسپارژیناز با دوز ۶۰۰۰ بر کودکان مبتلا به لوکمی لنفوبلاستیک حاد موردبررسی قرار دادند. در این بررسی DNA ژنومی به‌منظور تکثیر و کلون سازی ژن ال-آسپاراژیناز، استخراج و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن آسپاراژیناز انجام گردید. محصول PCR، پس از اتصال به وکتور، به باکتری *اشریشیاکلی* BL21 منتقل گشت، پروتئین نوترکیب حاصل با روش SDS-PAGE، آنالیز و فعالیت آسپاراژیناز سلول‌های ترانسفورم شده، با تست نسلر اندازه‌گیری شد. مقایسه توالی ژن کلون شده با توالی‌های موجود در بانک ژن با کمک نرم‌افزار BLAST، نشان داد که دارای بیشترین شباهت موجود بیش از ۹۹٪ با توالی‌های ثبت‌شده از برخی سویه‌های باکتری *اشریشیاکلی* BL21 بودند. سلول‌های ترانسفورم شده پروتئین نوترکیب را تولید کردند و نیز دارای فعالیت آسپاراژینازی بالایی بودند (۱۳). ناظمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی جداسازی و شناسایی مولکولی *باسیلوس*‌های تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز خارج سلولی از خاک پرداختند و نشان دادند که آنزیم آسپاراژیناز نقش مهمی در درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد ایفا می‌کند. هدف این تحقیق، جستجو و معرفی آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز خارج سلولی تولیدشده توسط جنس *باسیلوس* بود که به‌طور بالقوه می‌توانند خصوصیات سرولوژیک مطلوب‌تر و عوارض جانبی کمتری نسبت به انواع تجاری رایج داشته باشند. کلنی‌های تولیدکننده‌ی آنزیم موردنظر، بر اساس تغییر رنگ محیط متمایز گردیدند. سپس آنزیم تولیدشده، خالص‌سازی گشته و میزان فعالیت آن موردبررسی قرار گرفت. همچنین وزن مولکولی آنزیم اندازه‌گیری شد. *باسیلوس*‌های تولیدکننده آنزیم دارای فعالیت مطلوب، با روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه‌های جدید *باسیلوس* تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز شناسایی شدند و خصوصیات کلی آنزیم‌های استخراجی مطالعه گردید. ازآنجاکه ال- آسپاراژیناز جداشده از باکتری‌های مختلف دارای اثرات ضد سرطانی متفاوتی بوده است، جستجو برای یافتن میکروارگانیسم‌های تولیدکننده این آنزیم، یکی از راه‌های اصلی جهت دست‌یابی به آنزیمی با خصوصیات درمانی ایده‌آل است (۱۹). نتایج تحقیقات همانند نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر بیانگر این موضوع هستند که باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های مناسبی جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز می‌باشند.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط ایزدپناه و همکاران صورت گرفت این محققین به دنبال سویه‌های جدید *باسیلوس* جهت ارزیابی وجود آنزیم ال آسپاراژیناز بودند. این محققین سویه جدیدی از *باسیلوس* به نام *باسیلوس* PG02 با تولید میزان بالای آنزیم ال آسپاراژیناز معرفی نمودند. همچنین با استفاده از کروماتوگرافی و SDS-PAGE نشان دادند که این ال آسپاراژینازها دارای وزن مولکولی ۳۸ kDa بودند و این آنزیم‌ها در pH= ۵-۱۰ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد فعال بودند. نتایج این تحقیق همانند نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که گونه‌های *باسیلوس* همانند گونه‌های *استرپتومایسس* منابعی ارزشمند جهت جداسازی آنزیم‌های جدید ال آسپاراژیناز می‌باشند (۲۰).

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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

با توجه به بیان بالای آنزیم ال آسپاراژیناز توسط *اشریشیاکلی اورگامی* نوترکیب، آن را یک گزینه مناسب جهت تولید انبوه آنزیم ال آسپاراژیناز در صنعت معرفی نمودند (۲۱). نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه با نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه دارای مطابقت بود و نشان داده‌شده که *اشریشیاکلی* میکروارگانیسم مناسبی جهت تولید آنزیم ال آسپاراژیناز است.

در مطالعه‌ای دیگر که در هند انجام شد Amena و همکاران به بررسی تولید، خالص‌سازی و خصوصیات ال آسپاراژیناز توسط *استرپتومایسس گولبارجنسس* پرداختند. این محققین آنزیم ال آسپاراژیناز را به‌عنوان 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 مناسب‌ترین دما برای تولید این آنزیم دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد معرفی شد. از طرفی با استفاده از SDS-PAGE تولید این آنزیم مشخص شد و وزن مولکولی این آنزیم kDa ۸۵ گزارش شد. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه همانند نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر اثبات‌کننده 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 یک‌گونه *سیانوباکتر* به نام *سینکوکوکوس الونگاتوس* پرداختند. این محققین متوجه این امر شدند که این‌گونه *سیانوباکتر* توانایی تولید آنزیم ال آسپاراژیناز را دارا است. سپس ژن آنزیم ال آسپاراژیناز را از این *سیانوباکتر* جداسازی کردند و در باکتری *اشریشیاکلی* BL21 کلون نمودند. تائید تولید این آنزیم ال آسپاراژیناز جدید با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد که نشان داده شد این آنزیم دارای وزن مولکولی kDa ۳۵ است. همچنین pH نرمال جهت تولید این آنزیم را ۷/۵ اعلام نمودند (۲۳). نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه مشخص نمود که میکروارگانیسم‌ها منبع ارزشمندی از تولید ال آسپاراژیناز‌های جدید می‌باشند و همانند نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر جداسازی این آنزیم و کلون در باکتری *اشریشیاکلی* می‌تواند منجر به تولید انبوه آن‌ها شود.

تولید آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز جدید با کارایی بیشتر و اثرات جانبی کمتر به‌صورت تجاری می‌تواند در درمان لوکمی لنفوبلاستیک کودکان انقلابی بزرگ پدید آورد. آنزیم آسپاراژیناز از منابع مختلفی ازجمله میکروارگانیسم‌ها 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 به‌وسیله 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 پایان‌نامه ۲۲۵۳۰۵۲۸۹۷۲۰۰۶ نهایت تشکر و قدرانی را داریم.

تعارض منافع

تعارض منافعی برای نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Khattab 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.

www.SID.ir

Archive of SID
جداسازی و تخلیص آنزیم ال آسپاراژیناز

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

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, Raee 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 extendedspectrum 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 Nocardiopsis 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

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 H[1], Amini K[2*], Shushtarian SMM[3]

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 purifiy 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 $CaCl_2$ 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

www.SID.ir