تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی

دوره چهارم، شماره شانزدهم، پائیز ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه و ارزیابی کلون‌کردن ژن آنزیم L-آسپاراژیناز Escherichia coli II در Bacillus subtilis

حمید حسینیان[۱]، بهناز برزمینی[۱]

۱. دانشگاه آزاد واحد دامغان، بخش میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: ال-آسپاراژیناز **II** کاربرد مؤثری در درمان لوسمی لنفوبلاستیک (ALL) دارد. این آنزیم از منابع باکتریایی جدا شده و به‌صورت تجاری به‌عنوان داروی ضدسرطان عرضه می‌شود. سلول‌های سرطانی برخلاف سلول‌های نرمال، نیاز شدیدی به ال-آسپاراژین دارند، در صورت به‌کارگیری ال-آسپاراژیناز II (E.C. 3.5.1.1) ال-آسپاراژین به ال-آسپارتات و آمونیوم تبدیل می‌شود که در نهایت به تخریب سلول‌های سرطانی منجر می‌شود. هدف از این پژوهش، کلون‌کردن ژن ال-آسپاراژیناز **II** E. coli در B. subtilis جهت تولید انبوه این آنزیم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: ژن ال-آسپاراژیناز **II** (ansB) با روش PCR از E. coliBL21 جدا گردید. قطعه تکثیر یافته و شاتل وکتور بیانی pMR12 توسط آنزیم‌های **Hind III**، **BamH I** هضم شد. واکنش اتصال بین قطعه‌ی PCR و شاتل وکتور بیانی برش خورده با روش استاندارد انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد، وکتور نوترکیب با روش شوک با $CaCl_2$ سرد به E. coliJM101 ترانسفورم شد. در نهایت به میزبان B. subtilis با روش شیمیایی انتقال یافت.

یافته‌ها: در این مطالعه، ژن ansB به‌وسیله PCR از E. coliBL21 جدا و توسط تجزیه و تحلیل آنزیمی محصول PCR تأیید گردید و در شاتل وکتور بیانی pMR12 کلون شد. سپس وکتور نوترکیب ابتدا در E. coli کلون گردید و وجود ژن 1047 bp با تجزیه و تحلیل آنزیمی و واکنش PCR تأیید شد به دنبال آن داخل B. subtilis کلون شد و استخراج پلاسمید انجام گرفت و با باند شاتل وکتور بیانی pMR12 دارای ژن ansB به‌صورت صحیح، مقایسه و تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق با استفاده از شاتل وکتور بیانی pMR12 ژن ansB را در B. subtilis کلون شد. این مطالعه، اولین گزارش کلونینگ ژن ansB در B. subtilis است.

کلمات کلیدی: ال-آسپاراژیناز **II**، pMR12، کلونینگ، E. coli، B. subtilis.

مقدمه

آنزیم ال-آسپاراژیناز (amidohydrolase E.C.3.5.1.1) در درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد به‌کار می‌رود (۲۱). این

نویسنده مسئول: حمید حسینیان

پست الکترونیکی: Hamid.hos83@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۵/۲۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم L- آسپارژین را دآمینه کرده و به ال-آسپاراتات و آمونیوم هیدرولیز می‌کند (۱۱،۳،۲).

L-asparaginase

L-aspargine+H_2O ⟶ L-aspartate + ammonia

ال – آسپارژیناز II در بافت‌های جانوری، گیاهان، باکتری‌ها و در سرم جوندگان دیده شده است (۴). در میان پستانداران، تنها سرم خوکچه هندی دارای فعالیت قابل توجه ضدتوموری است. Mashburn و Wriston نشان دادند برخی از سویه‌های اشریشیاکولی فعالیت آسپاراژینازی از خود نشان داده و ال-آسپاراژیناز خالص شده از E. coli، مشابه سرم خوکچه دارای خواص ضدتوموری است (۱۹،۹). با توجه به ویژگی‌های این آنزیم می‌توان آن را در دو گروه اصلی تقسیم کرد. ال-آسپاراژیناز نوع **I** (ansA) سیتوپلاسمی بوده و میل ترکیبی پائینی برای آسپاراژین دارد و به عنوان آنزیم درون سلولی مطرح می‌شود؛ در حالی‌که نوع **II** (ansB) پری پلاسمی بوده و میل ترکیبی بالایی برای آسپاراژین دارد و در پاسخ به کمبود نیتروژن ترشح می‌شود. ال-آسپاراژیناز نوع **II** برخلاف نوع **I** در شرایط بی‌هوازی بیان می‌شود و دارای ویژگی ضدتوموری بالایی است (۲۷،۱۵،۶). بیشترین فعالیت ال-آسپاراژیناز نوع **II** در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۶ تا ۷ بوده است و در برخی موارد تا دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد نیز فعالیت دارد که نشان‌دهنده این موضوع است که این آنزیم در طیف وسیعی از دما و pH پایدار است (۵). سلول‌های سرطانی خون فاقد توانایی سنتز اسیدآمینه آسپاراژین در درون سیتوپلاسم خود هستند. از این رو، این سلول‌ها آسپاراژین مورد نیاز جهت سنتز پروتئین‌ها را از سرم خون خود تأمین می‌کنند. 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 کمبود آسپاراژین قرار می‌گیرند که در این صورت رشد سلول-های سرطانی متوقف شده و یا حتی منجر به مرگ آن می‌شود (۲۵،۱۷،۶).

از فاکتورهای محدودکننده در درمان با ال-آسپاراژیناز، حساسیت بالا است که محدوده آن از واکنش‌های آلرژیک ملایم تا شوک آنافیلاکتیک می‌باشد (۱۳،۹). هم‌چنین بسیاری از آنزیم‌های کلاس II هیدرولیز کننده‌ی ال-آسپارژین و ال-گلوتامین بوده که در صورت تجزیه ال-گلوتامین عوارض جانبی شدید مانند واکنش‌های عصبی، هپاتیت و اختلالات بالینی ایجاد می‌کنند. اگرچه باید این را یادآور شد که در برخی از باکتری‌های گرم منفی از جمله Escherichia coli و Erwinia carotovora، ال-آسپارژیناز تمایل بیشتری برای هیدرولیز ال-آسپارژین نسبت به ال - گلوتامین را دارند (۲۶،۲۱). هدف این پژوهش کلون کردن ژن آنزیم ال-آسپاراژیناز (ansB) از E. coliBL21 در B. subtilis سویه WB600 با استفاده از شاتل وکتور بیانی pMR12 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، B. subtilis سویه WB600 و شاتل وکتور بیانی pMR12 اهدایی از طرف دکتر مجید مقبلی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین ایزوله‌های E. coliBL21 و E. coliJM101 تهیه شده از کلکسیون میکروبی انیستیتو پاستور ایران استفاده گردید. سویهE.coli BL21 در محیط مغذی Luria Bertani(LB) که حاوی ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم کلرید سدیم، ۱۶ گرم آگار به حجم ۱ لیتر آب مقطر، کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از رشد و جداسازی سلول‌ها از محیط کشت، DNA کروموزومی باکتری‌ها توسط کیت استخراج DNA ژنومیک (Roche, Germany) با دستور-العمل شرکت سازنده استخراج شد (۲۲). واکنش PCR مطابق با روش‌های استاندارد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن ansB که پرایمر F با ترادف‌بازی 5´aag ctt ATG GAG TTT TTC AAA AAG A3´ (۲۵bp) و پرایمر R با ترادف‌بازی 5´gga tcc TTA GTA CTG ATT GAA GAT CTG3´ (۲۷bp) طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید. پرایمر F دارای جایگاه برش برای آنزیم **Hind III** و پرایمر R دارای جایگاه برش برای آنزیم **BamHI** (جایگاه‌ها با حروف کوچک مشخص است) بود. واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۳۰ میکرولیتر PCR mix، ۲ واحد آنزیم Pfu (GeneAll, Korea)، یک میکرولیتر از هر پرایمر و یک میکرولیتر از نمونه DNA الگو انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C و ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۹°C به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه

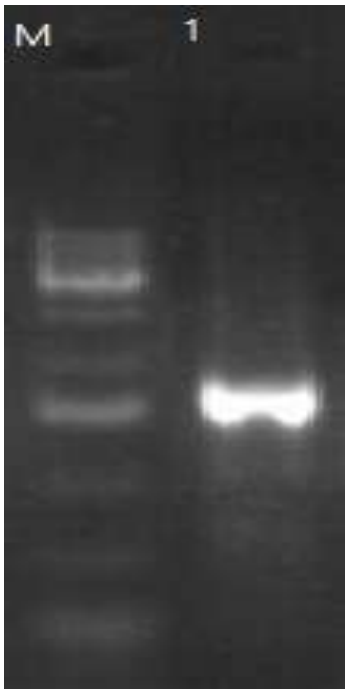
Archive of SID

www.SID.ir

انجام شد. محصول روی ژل آگارز ۱ درصد (Merk, Germany)، حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی Vivantis Nucleic Acid Extraction Kit خالص‌سازی شد. سپس به‌وسیله آنزیم-های **(**Korea, Enzynomics BamH**I)**، (United States, Fermentas Hind**III** FastDigest)، شاتل وکتور بیانی pMR12 و محصول PCR را برش داده و توسط آنزیم (Korea Enzynomics,) T4 DNA Ligase، واکنش اتصال (Ligation) بین ۶۰۰ng محصول PCR و ۲۰۰ng شاتل وکتور بیانی pMR12 طبق روش استاندارد (۲۲) انجام شد. سپس محصول الحاق شده با روش شوک با $CaCl_2$ سرد به E. coliJM101 ترانسفورم شد. ۱۰۰µl از مخلوط را روی محیط کشت LB Agar حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰µl/ml)(Sigma, USA) کشت داده شد. استخراج پلاسمید از کلنی‌های رشد یافته انجام گرفت و کلنی‌های مورد نظر حامل ژن ansB براساس اندازه آنها روی ژل، تجزیه و تحلیل با آنزیم‌های تحدیدی انتخاب شدند. جهت تهیه B. subtilis حامل ژن ansB، ۸µl شاتل وکتور بیانی pMR12 حامل ژن با روش شیمیایی (OptimizedTransformation Buffer) به *B.* subtilis WB600 ترانسفورم شد. سپس ۱۰۰µl از سوسپانسیون ترانسفورم، بر روی پلیت LB Agar واجد (کانامایسین) (10µg/ml) با میله‌ی شیشه‌ای خم استریل پخش شد. پلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

نتایج

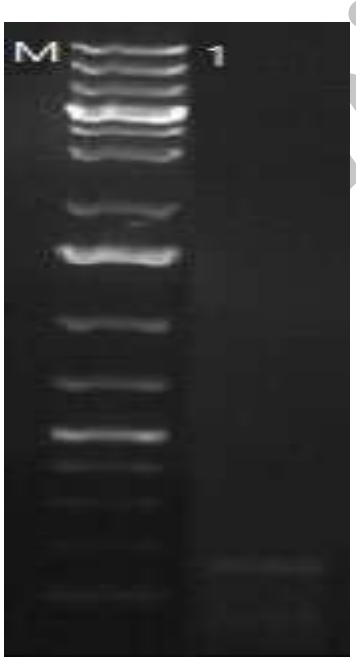
کلون کردن ژن ansB در E. coliJM101. بعد از جداسازی DNA کامل باکتری E. coliBL21، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، PCR انجام شد و باند ۱kb (شکل ۱) به‌دست آمد. باهضم محصول PCR توسط آنزیم Pst**I** دو باند ۰/۴kb و ۰/۲kb حاصل شده است (شکل۲). بر اساس نمودار ژن (شکل۳) و باندهای حاصله، محصول PCR را تأیید کرد. انتقال واکنش اتصال بین محصول PCR و شاتل وکتور بیانی pMR12 و کشت روی پلیت LB Agar واجد آمپی‌سیلین، تعداد بسیار زیاد کلنی رشد کردند. ۵ کلنی، انتخاب و کشت داده و از آنها استخراج پلاسمید گردید؛ ۲ نمونه دارای پلاسمیدهای با اندازه مورد نظر بودند. بر روی این ۲ نمونه واکنش هضم با آنزیم‌های Hind**III**، BamH**I** به‌طور هم‌زمان گذاشته شد و نمونه‌ها الکتروفورز گردیدند (شکل۴). با توجه به نتایج حاصل از واکنش‌های هضم، ژن در ۲ نمونه به‌صورت صحیح داخل شاتل وکتور بیانی pMR12 قرار گرفته است.



شکل ۱. محصول PCR

M: مارکر (1Kb DNA ladder)

۱: محصول PCR

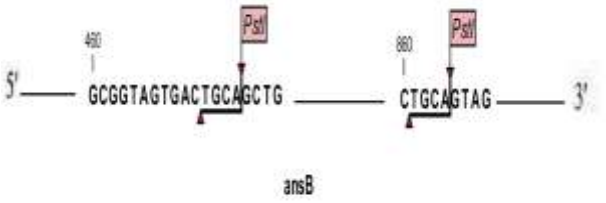


شکل ۲. محصول هضم آنزیمی PCR

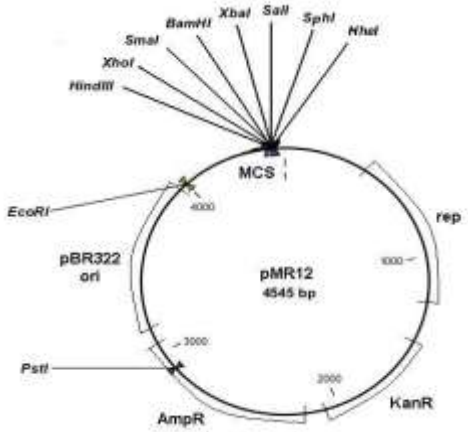
M: مارکر (1Kb DNA ladder)

۱: هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم Pst**I**

www.SID.ir



a

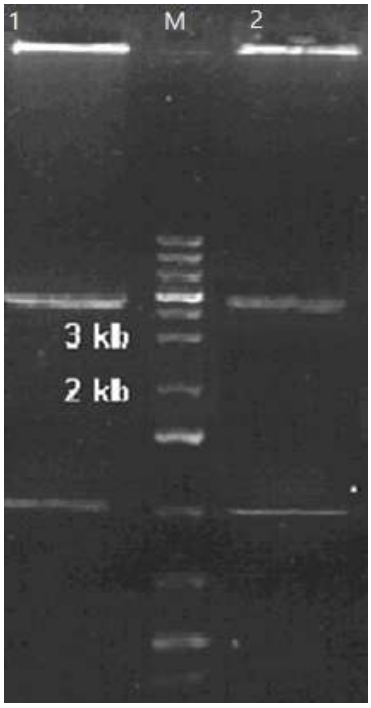


b

شکل ۳.نمودار ژن ansB، پلاسمید pMR12

a. نمودار ژن ansB: ژن ansB با اندازه ۱۰۴۷bp که جایگاه Pst**I** در دو ناحیه ژن قرار دارد که این ژن را به سه قسمت تبدیل می‌کند و جایگاه‌های Hind**III**، BamH**I** بر روی ژن قرار گرفته‌اند.

b.نقشه ژنتیکی ناقل بیان کننده pMR12.



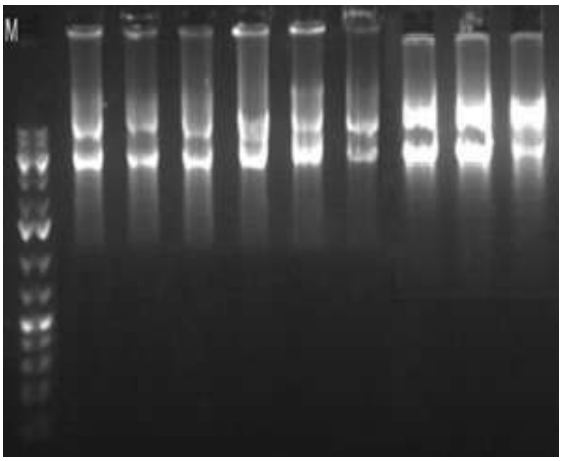
شکل۴. واکنش هضم آنزیمی پلاسمید

۱: هضم نمونه۱ با آنزیم‌های Hind**III**، BamH**I**

M: مارکر(1Kb DNA ladder)

۲: هضم نمونه۲ با آنزیم‌های Hind**III**، BamH**I**

کلون کردن ژن ansB در B. subtilis. پلاسمید نوترکیب با روش شیمیایی به B. subtilis WB600 ترانسفورم شد. پس از ۱۸ ساعت تعداد ۹ کلنی بر روی محیط رشد کردند. از تمام نمونه‌ها استخراج پلاسمید صورت گرفت و با باند شاتل وکتور بیانی pMR12 دارای ژن ansB به‌صورت صحیح، مقایسه شدند (شکل۵).



شکل۵. نمونه‌های پلاسمیدی استخراج یافته از ۹ کلنی و یک پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل مثبت در کنار مارکر قرار دارد.

بحث

تولید آنزیم ال-آسپارژیناز به‌صورت تجاری در درمان لوکمیای لنفوبلاستیک انقلابی بزرگ پدید آورده است. آنزیم آسپاراژیناز از منابع متعددی مانند باکتری Proteus vulgaris (۱۸)، Acinetobacter calcoaeticu (۱۶)، Mycobacterium bovis (۲۴)، Yersinia pseudocola (۱)، قارچ‌های رشته‌ای (۲۳) جداگردیده است، اما آنزیم حاصل از آنها فعالیت ضدتوموری ندارند (۲۷). در حال حاضر آسپاراژیناز تولید شده توسط E. coli و E. carotovora برای درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد به‌کار می‌رود (۱۴،۷). کلنی‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب در مقایسه با سویه‌های عادی، آسپاراژیناز بیشتری را تولید می‌کنند(۸). B. subtilis به سبب غیربیماری‌زا بودن و توانایی ترشّح مقادیر زیاد پروتئین به داخل محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

(تولید ۶۰٪ از پروتئین‌های تجاری توسط B. subtilis) و داشتن اطلاعات کافی به‌منظور رونویسی، ترجمه و ایجاد ساختار سه‌بعدی پروتئین و در پی آن مکانیسم‌های ترشحی به عنوان یک میزبان خوب برای کلون و بیان ژن محسوب می-شود. برای کلون کردن ژن در B. subtilis، تعداد زیادی از وکتورها ساخته شده‌اند (۱۲،۱۰). در برخی موارد به‌دلیل فراوانی پایین ترانسفورم B. subtilis به عنوان میزبان اولیه بهتر است مراحل آغازین کلونینگ، به کمک یک پلاسمید شاتل، در E. coli هدایت شود و سپس پلاسمیدهای نوترکیب را به B. subtilis انتقال داده شود (۲۰). سیگنال پپیتید ژن آسپارژیناز E. coli می‌تواند به عنوان سیگنال پپتید در B. subtilis استفاده گردد. در مطالعه حاضر کلونینگ توسط شاتل وکتور بیانی pMR12 در B. subtilis انجام گرفت.

آنزیم ال-آسپاراژیناز **II** در درمان مولکولی لوکمی، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشته است. در حال حاضر این آنزیم از باکتری‌های E. coli جداسازی و به‌صورت تجاری به عنوان داروی ضدسرطان (لوکمی لنفوبلاستیک حاد) تولید می‌شود. بنابراین نتایج به‌دست آمده در این مطالعه در راستای ایجاد میزبان نوترکیب با قابلیت بیان بالای ال-آسپاراژیناز **II**، می-تواند گامی بزرگ در مسیر افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب شود.

سپاسگزاری

نویسنده این مقاله از جناب آقای دکتر مجید مقبلی که بسیاری از منابع را تأمین نمودند سپاسگزار است.

منابع

(1) Abakumova L, Podobed O. Antitumor activity of L asparaginase from Yersinia pseudoculosis. Biomed Khim, 2008;54:712-719.
(2) Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. "Do bacterial L-asparaginase utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu? ". J Biochem, 2001;1550:117-128.
(3) Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. "Structural basis for the activity and substrate specificity of Er. Chrysanthemi L- asparaginase ". J Biochem, 2001;40:5655-5664.
(4) Aghaeepoor M, Mozafari S, khodabandeh M, Tabandeh F, Bambai B. High level of extracellular fermentation and alternative purification of Escherichia coli Asparaginase II. (full text in Persian)Biharean Biologist, 2011;5(2):96-101.
(5) Bansal S, Gnaneswari D, Mishra P, Kundu B. Structural Stability and Functional Analysis of L-Asparaginase from Pyrococcus furiosus. Biochemistry (Moscow),2010;75(3):457-464.
(6) Cedar H, Schwartz J. Production of L-Asparaginase II by E. coli. Journal of Bacteriology, 1968;96:2043-2048.
(7) Campbellet H, Mashburn L, Boys E. Two L-asparaginase from E. colitheir separation, purification and anti tumor activity. J Biochem, 1967;6:721-726.
(8) Corena CP, Lupescu I, Vatafu I, Caraiani T, Savoiu VG, Campeanu GH, Grebenisan I, Negulescu GHP, Constantinescu D. Production of L-asparaginase II by recombinant Escherichia coli cells. Roum. Biotechnol. Lett, 2002;7(3):717-772.
(9) Ebrahiminezhad A, Amini S, Ghasemi Y. L-Asparaginase Production by Moderate Halophilic Bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. Indian J Microbiol, 2011; 51(3):307–311.) full text in Persian
(10) Erlangung Z. Construction of plasmid-based expression and secretion vectors and study of the immobilization of proteins on the surface of Bacillus subtilis cells.
(11) Georgia A, Kotzia NikoLaos E. "L-Asparaginase from Erwinia chrysanthemi 3937: cloning, expression and characterization". Biothechnol, 2007;127:657-669.
(12) Gryczan T, Contente S, Dubnau D. Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a plasmid vector and a homologous resident plasmid in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet, 1980;177:459-467.
(13) Harms E, Wehner A, Aung H, Rohm K.H. "A catalytic role for threonine 12 of E.coli asparaginaseII as established by site-directed mutagenesis". FEBS, 1991;285:55-58.
(14) Helianti I, Ulfah M, Nurhayati N, Nurhasanah A, Lestari K, Apriyogenies F. cloning of asparaginase gene from Eschericia coli TOP10 under control of Bacillus subtilis AQ1 endoxylanase promoter in Eschericia coli DH5A and Bacillus subtilis DB104. 2012.
(15) Huser A, Kloppner U, Rohm K. Cloning, sequence analysis, and expression of ansB from Pseudomonas fuorescens, encoding periplasmic glutaminase/asparaginase. FEMS Microbiology Letters, 1999;178:327-335.
(16) Jones P, Kristian T, Einarsson M. Purification and properties of Lasparaginase from acinetobacter calcoaeticus. Biochem Biophys Res Commun, 1973;48:35-40.
(17) Kozak M, Jurgab S. A comparison between the crystal and solution structures of E. coliasparaginase II. Acta Biochem Pol, 2002;49:509-513.
(18) Lee B, Yang H. Crystalographic studies on L-asparaginase from Proteus vulgaris. J Biol Chem, 1973;248:7620-7625.
(19) Mashburn L, Wriston J.Tumor inhibition effect of L-asparaginase from E. coli. Arch Biochem Biophys, 1964;105:450-452.
(20) Nakamura K, Nakamura A, Takamatsu H, Yoshikawa H, Yamane K. Cloning and characterization of a Bacillus subtilis gene homologous to E. colisecY. J Biochem, 1990;107:603-607.

Archive of SID
www.SID.ir

(21) Oza V, Parmar P, Patel D. Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from Withania somnifera L. for large scale production. Biotech, 2011;1:21–26
(22) Sambrok J, Russell D, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press), 2001;450-475.
(23) Sarquis M, Olivera A, Santos A, Costa G. Production of Lasparaginase by filamentus fungi. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004;99:489-492.
(24) Sorua E, Teodorescu M, Zaharia O. L-asparaginase from the BCG strain of Mycobacterium bovis. Can J Biochem, 1972;50:1149-1150.
(25) Swain L, Jaskolski M. Crystal structure of L asparaginase. Pros Natl Acad Sci Usa, 1993;90:1474-1478.
(26) Vidya1 J, Vasudevan UM, Socco CR, Pandey A. Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from E. coliMTCC 739. Food Technol. Biotechnol, 2011;49(3):286–290
(27) Youssef MM, Al-Omair MA. Cloning, purification, characterization and immobilization of l-asparaginase II from E. coliW3110. Asian J. Biochem, 2008;3(6):337-350.

Archive of SID

www.SID.ir