Archive of SID

خالص سازی وتعیین خصوصیات کینتیکی آنزیم آسپاراژیناز در باکتری *Serratia marcescens*

لیلا آب خویی، داریوش مینایی تهرانی*، مینا کلاهدوز محمدی، فرشته افتخار، نیلوفر کرجی، فرزانه میر فخار و نازنین وزیری تبار

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۹

چکیده

آسپاراژیناز یک آنزیم هیدرولاز می باشد که آسپاراژین را به آمونیوم و آسپارتیت تبدیل می کند. این آنزیم کاربرد مؤثری در درمان لوسمی لنفوبلاستیک دارد. *Serratia marcescens* یک باکتری گرم منفی است که کلنیهای آن دارای رنگیزه قرمز می باشند که می تواند در صورت حضور آسپاراژین در محیط کشت خود، تولید آنزیم آسپاراژیناز نماید. در این تحقیق آنزیم آسپاراژیناز از محیط کشت *Serratia* خالص سازی و همچنین فاکتور های کینتیکی آن تعیین شد. باکتری *Serratia* در محیط مایع حاوی پپتون، عصاره مالت و آسپاراژین کشت شد و محیط بعد از ۴۴ ساعت سانتریفیوژ شد و محلول رویی که دارای آنزیم آسپاراژیناز بود برای مطالعات کینتیکی و خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. مراحل تخلیص آنزیم با استفاده از رسوب دهی با آمونیوم سولفات و به دنبال آن دیالیز و ستون کروماتوگرافی DEAE سلولز انجام شد. انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE باندی با وزن مولکولی تقریبی حدود ۵۴ kDa را بر روی ژل نشان داد که نشان دهنده خلوص آنزیم بود. مقایسه تأثیر تغییرات pH (۱۰-۴) بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH ۷ است، و بررسی تغییرات دما بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد. همچنین مقدار فاکتور های کینتیکی V_{max} و K_m در این آنزیم مشخص گردید.

واژه های کلیدی: آنزیم، آسپاراژیناز، *Serratia marcescens* ، فاکتور های کینتیکی، خالص سازی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۳۱۴۴ ، پست الکترونیکی: D_MTehrani@sbu.ac.ir

مقدمه

آسپاراژیناز (EC: 3.5.1.1) یک آنزیم هومو تترامر است که سبب شکستن آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک می شود. طبق مشاهدات Kidd در سال ۱۹۵۳ (۱۱)، قدرت درمانی آسپاراژیناز توسط فعالیت آن در سرم خوکچه هندی کشف شد که باعث بهبود سرطان لنفومای پیوند زده شده در موش و نیز موش صحرایی شد. مطالعات بعدی توسط Broome در سال ۱۹۶۱ نشان داد (۴) که فعالیت ضد سرطانی سرم خوکچه هندی به واسطه آنزیم آسپاراژیناز بوده است. در آزمایشات انجام شده در سلولهای کارسینومای Walker 256 و لوسمیL5178، مشخص شد که این سلولها به حضور آسپاراژین به عنوان یک اسید آمینه برای رشد در محیط کشت بافت نیاز دارند. در سال ۱۹۶۹، Campbell (۶) نشان داد که آسپاراژیناز به دست آمده از *E. coli* نیز دارای فعالیت ضد سرطانی می‌باشد. این یافته‌ها منجر به تشخیص آنزیم آسپاراژیناز برای درمان لوسمی شد و محققین را برای تولید بیشتر و تحقیقات بر روی آنزیم آسپاراژیناز تشویق نمود. امروزه آسپاراژیناز مورد استفاده در پزشکی شامل دو فرم دست نخورده و طبیعی می باشد که از دو باکتری *E. coli* و نیز *Erwinia aroideae* خالص‌سازی شده است. همچنین یک

www.SID.ir

Archive of SID

شکل تغییر یافته از آنزیم به نام PEG-L-asparaginase به دست آمده از *E. coli* تهیه شده است که شامل فرم طبیعی آنزیم است که به طور کووالانسی به monomethoxypolyethyleneglycol متصل شده است و در بیمارانی استفاده می‌شود که حساسیت بالا به فرم طبیعی آنزیم دارند (۶).

آسپاراژیناز در درمان بیماری لنفوبلاسیک لوسمی حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) و نیز در درمان لوسمی حاد میلوسیتیک و میلومنوسیتیک، لنفوماهای هوچکینی و غیرهوچکینی و ملانوسارکوما به کار می رود (۳) سلولهای سرطانی در سنتز اسید آمینه غیر ضروری آسپاراژین ناتوان می‌باشند، در حالی‌که سلولهای طبیعی قادر به تولید آسپاراژین مورد نیاز خود هستند. حضور آنزیم آسپاراژیناز در خون سبب تجزیه آسپاراژین شده و سلولهای سرطانی را از دسترسی آسپاراژین موجود در خون محروم می نماید (۱۶). آسپاراژیناز در میان عوامل شیمی‌درمانی سرطان حداقل به دو دلیل منحصر به فرد است. اول اینکه آنزیم می‌تواند فعالیت سیتوتوکسیتی خود را در مکانهایی دور از تومور اعمال نماید و دوم اینکه آسپاراژیناز یک پروتئین کاتالیتیکی است و یک مولکول از آنزیم هزاران مولکول آسپاراژین را در عرض یک دقیقه کاهش می‌دهد (۱۴).

باکتریهای زیادی از جمله *Escherichia coli*، *Serratia marcescens*، *Erwinia aroideae*، *Proteus vulgaris* و *Mycobacterium tuberculosis* قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز می باشند (۱، ۶ و ۱۵). مقایسه آسپاراژیناز خالص شده از باکتریها نشان دهنده تنوع در ساختمان و فعالیت آنها است. مقایسه آسپاراژیناز به دست آمده از باکتریهای *E.Coli* و *Erwinia carotovora* تفاوت زیادی را در رفتار آنها نشان داد به طوری که آنزیم جدا شده از *Er. carotovora* بسیار قلیایی تر، در طیف وسیعی از تغییرات pH (۳ تا ۱۲) فعال و در pH قلیایی بسیار مقاوم است. در آنزیم جدا شده از *E.coli* هیچ گونه اسید آمینه تریپتوفان و سیستئین و پیوند دی سولفید یافت نشد در حالی که در *Er. carotovora* حضور آنها مشخص شده است (۹). محیط رشد و کشت باکتری در مقدار تولید آسپاراژیناز و همچنین در ایجاد ایزوزیمهای آسپاراژیناز مؤثر است. در یک مطالعه، یک محیط حداقل و مناسب برای ردیابی و جستجوی باکتریهای *E.coli* جدا شده از رودخانه، پساب و نمونه های کلینیکی ساخته شد که توسط این محیط به خوبی باکتریهای تولید کننده آنزیم اسپاراژیناز از لحاظ کمی مشخص می شد (۷). همچنین یک محیط غنی طراحی شد که می توانست بهترین حالت را برای تولید آسپاراژیناز را در باکتری *Erwinia carotovora* ایجاد کند (۱۳).

در این تحقیق، تولید آسپاراژیناز در باکتری *Serratia* در یک محیط کشت جدید مورد مطالعه قرار گرفت و تفاوت وزن مولکولی آنزیم در محیط جدید با آنزیمهایی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند بررسی شد. همچنین فاکتورهای کیبتیکی آنزیم مشخص شد.

مواد و روشها

سویه باکتری: در این تحقیق از *Serratia Marcescens*سویه ATCC 60 که از آزمایشگاه باکتریولوژی دانشگاه شهید بهشتی فراهم آمد، جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز استفاده گردید. ابتدا باکتری بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار حاوی ۰/۵ درصد گلوکز کشت و نگهداری شد. سپس برای تولید آنزیم باکتری در محیط کشت حاوی g/L ۰/۵ پپتون، g/L ۰/۵ عصاره مالت، g/L ۰/۵ آسپاراژین به مدت ۴۴-۴۲ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد.

سنجش فعالیت آنزیم: به هنگام کشت باکتری در محیط مایع حاوی آسپاراژین، آنزیم در محیط کشت آزاد می شود. جهت تعیین فعالیت آنزیم آسپاراژیناز، ml ۱ از سوپرناتانت

www.SID.ir

Archive of SID

به دست آمده از سانتریفیوژ کشت باکتری با ml ۱ بافر تریس (۸ M, pH ۰/۱) و ml ۰/۵ آسپاراژین mg/ml ۶ مخلوط شد. پس از ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، به هر لوله ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۵ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد و لوله‌ها سانتریفیوژ گردیدند. پس از افزودن محلول نسلر (معرف نسلر برای تولید رنگ و سنجش آمونیاک تولید شده استفاده می شود) به ml ۱ از سوپرناتانت نمونه‌های سانتریفیوژ شده، جذب نوری در nm ۴۱۰ خوانده شد.

مطالعه کینتیک آنزیمی: تعیین فعالیت آنزیم و پارامترهای کینتیکی شامل K_m و V_{max} آنزیم با استفاده از محلول کشت باکتری (بدون رسوب دهی با آمونیوم سولفات) انجام گرفت. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاوی آنزیم به همراه ml ۱ بافر تریس M ۰/۱ با pH ۷ و ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترای آسپاراژین با غلظتهای mM ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ استفاده شد. لوله ها به مدت ۱، ۳، ۵، ۱۰و ۱۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بقیه مراحل مطابق روش ذکر شده در سنجش کمی آنزیم انجام شد و جذب نوری محلولها در nm ۴۱۰ اندازه‌گیری گردید.

تعیین دما و pH بهینه فعالیت آنزیم: برای این منظور نیز از محلول رویی کشت سلول استفاده شد، فعالیت آنزیم در دماهای ۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. برای تعیین pH بهینه نیز فعالیت آنزیم در pH های مختلف شامل بافر گلیسین (pH ۳)، استات (pH ۴–۵)، فسفات (pH ۶–۷)، تریس(pH ۸)، بورات (pH ۹–۱۰) اندازه گیری شد.

خالص سازی نسبی آنزیم: برای خالص سازی آنزیم به محلول کشت حاوی آنزیم به صورت تدریجی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد آمونیوم سولفات جامد اضافه شد تا به میزان ۵۰ درصد اشباع برسد. محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد سپس به مدت ۴۰ دقیقه در ۱۵۰۰×g سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب پروتئینی حاصل در بافر تریس (۸ M, pH ۰/۱) حل شد. در مرحله بعد از روش دیالیز برای حذف نمک آمونیوم سولفات استفاده شد. عمل دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد همراه با همزدن در بافر تریس (۸ M, pH ۰/۱) انجام شد. کیسه دیالیز به مدت یک شب غوطه ور در بافر و در یخچال نگهداری گردید در نهایت محلول دیالیز شده در دمای ۱۸– درجه سانتی گراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد. محلول به دست آمده از دیالیز از ستون حاوی DEAE سلولز عبور داده شد. برای خروج پروتئینها از ستون، از محلول NaCl با غلظت‌های M ۰,۱ تا ۱ استفاده شد و فرکشنهای به دست آمده برای اندازه گیری مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپاراژیناز مورد سنجش قرار گرفتند.

مقدار پروتئین در فراکشنهای حاصل از کروماتوگرافی، در طول موج nm ۲۸۰ و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (Shimatzu 1040) مشخص شد.

برای اندازه گیری مقدار پروتئین در نمونه سوپ محیط کشت حاوی آنزیم و محلول دیالیز شده از روش Lowry استفاده گردید(۱۷) .

تعیین فعالیت آنزیم: برای تعیین فعالیت آنزیم لازم بود ابتدا ضریب خاموشی (Extinction coefficient) محصول (یون آمونیوم) که از عملکرد آنزیم بر روی آسپاراژین ایجاد شده بود، محاسبه شود. برای این منظور غلظتهای مختلف سولفات آمونیوم تهیه شد و محلول نسلر (معرف آمونیوم) به آنها اضافه و جذب رنگ زرد ایجاد شده در طول موج nm ۴۱۰ اندازه گیری شد. منحنی غلظت بر علیه جذب رسم شد و شیب خط برای تعیین ضریب خاموشی در نظر گرفته شد. پس از محاسبه ضریب خاموشی ($۱,۶ \times ۱۰^{۳}$ $lit.mol^{-1}$) ابتدا مقدار آمونیوم تولید شده در هر بار سنجش آنزیمی محاسبه شد و سپس از فرمول زیر فعالیت آنزیم محاسبه گشت.

www.SID.ir

Archive of SID

U/ml =زمان سنجش × حجم آنزیم / مقدار میکرومول آمونیوم آزاد شده توسط آنزیم × مقدار محلول در سنجش آنزیمی

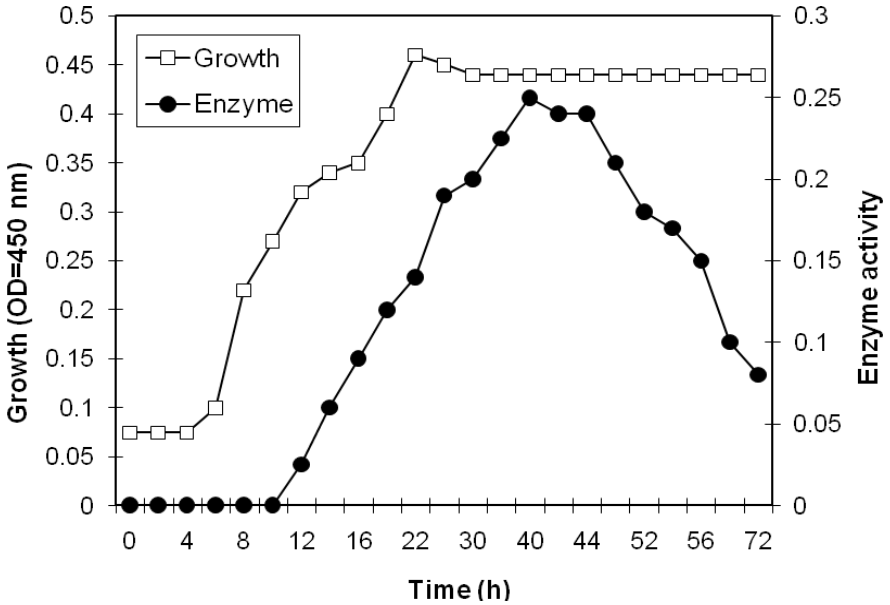
الکتروفورز عمودی به روش SDS-PAGE: به منظور مشخص کردن میزان خلوص و تعیین جرم مولکولی آنزیم از ژل آکریلامید با غلظت ۷/۵ درصد استفاده گردید و رنگ آمیزی ژل، با کوماسی بلو R-250 و نیترات نقره انجام شد. برای مشخص شدن وزن موکولی از مارکر استاندارد پروتئینی استفاده شد.

نتایج

تولید آنزیم و منحنی رشد: برای رسم منحنی رشد باکتری و همچنین تولید آنزیم در محیط کشت، از محیط کشت هر دو ساعت یکبار نمونه گیری شد و منحنی رشد رسم گردید (شکل ۱). فاز تأخیر (lag phase) در این باکتری در حدود ۴ ساعت بود و فاز لگاریتمی در حدود ۱۸ ساعت طول کشید که بعد از آن وارد مرحله سکون گردید. مطالعه همزمان فعالیت آنزیم نشان داد که تا ۱۰ ساعت پس از شروع کشت هیچ گونه فعالیت آنزیمی دیده نشد، ولی فعالیت آنزیم به تدریج در فاز لگاریتمی افزایش یافت و حداکثر فعالیت بعد از وارد شدن باکتری به مرحله سکون، بین ۴۴-۴۰ ساعت ثبت گردید.

تعیین pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم: برای تعیین pH بهینه آسپاراژیناز، فعالیت آنزیم در محدوده pH ۴ تا ۱۰ اندازه گیری شد (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم در pH های ۴ و ۱۰ و بیشترین فعالیت آنزیمی در pH ۷ دیده شد. برای تعیین دمای بهینه آنزیم ، فعالیت آن در محدوده دمایی ۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. همان طور که در شکل ۳ مشخص است بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد هیچ گونه فعالیتی ثبت نشد و آنزیم غیرفعال شد.

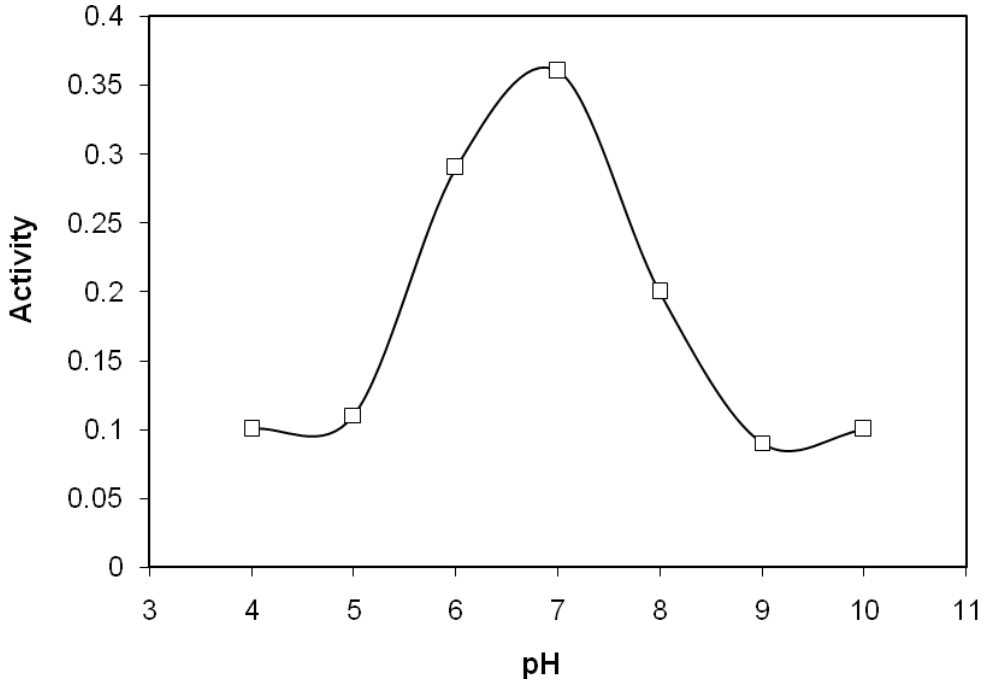
اندازه گیری فاکتورهای کینتیکی آنزیم: برای تعیین فاکتورهای کینتیکی آنزیم از منحنی Lineweaver-Burk با استفاده از عکس غلظت بر علیه عکس سرعت استفاده شد و K_m و V_{max} محاسبه گردید (شکل ۴). از نتایج به دست آمده مقدار K_m آنزیم در حدود ۰/۱۸ mM و مقدار V_{max} آن در حدود ۱۲/۵ mM/min تعیین شد.



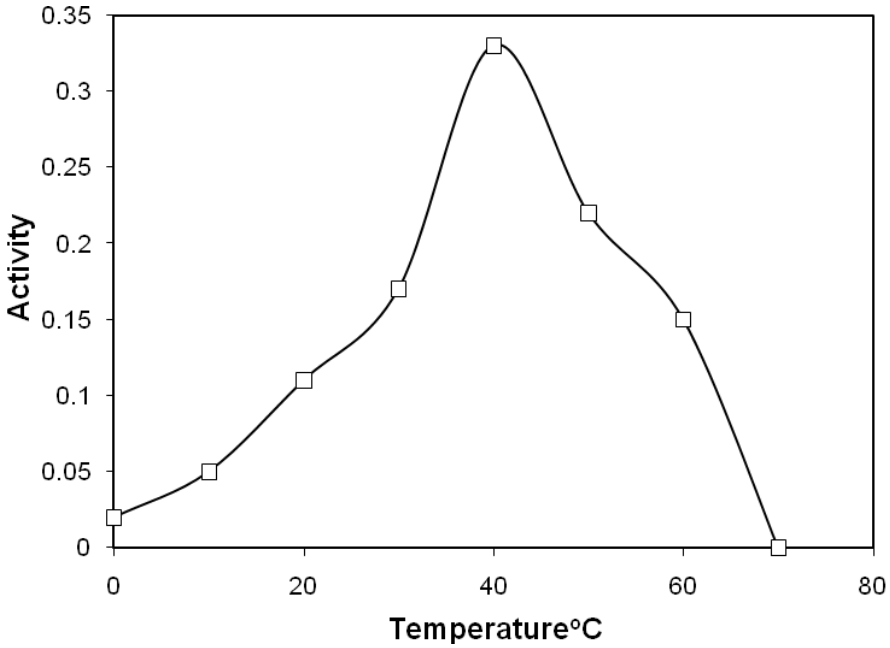
شکل ۱- منحنی رشد باکتری و تولید آنزیم در باکتری *Serratia marcescens*. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در ابتدای فاز ثابت رشد باکتری دیده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- منحنی فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محدوده pH ۱۰-۴

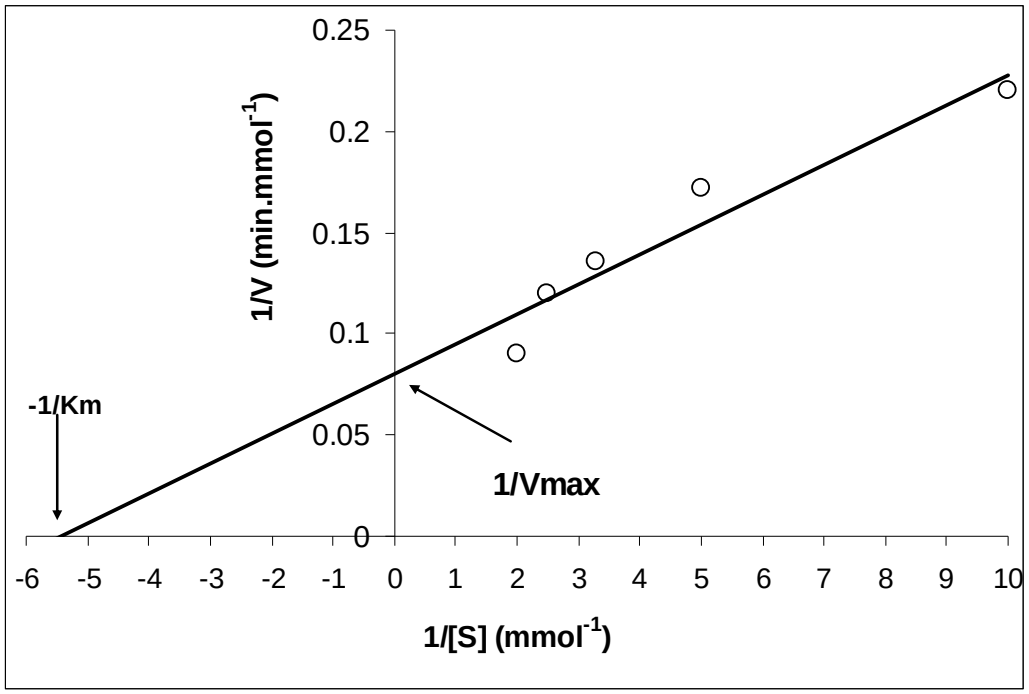


شکل۳- منحنی فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محدوده دمایی ۷۰- ۰ درجه سانتی گراد. در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بیشترین فعالیت دیده شد و در دمای ۷۰ درجه آنزیم کاملا غیر فعال شد.

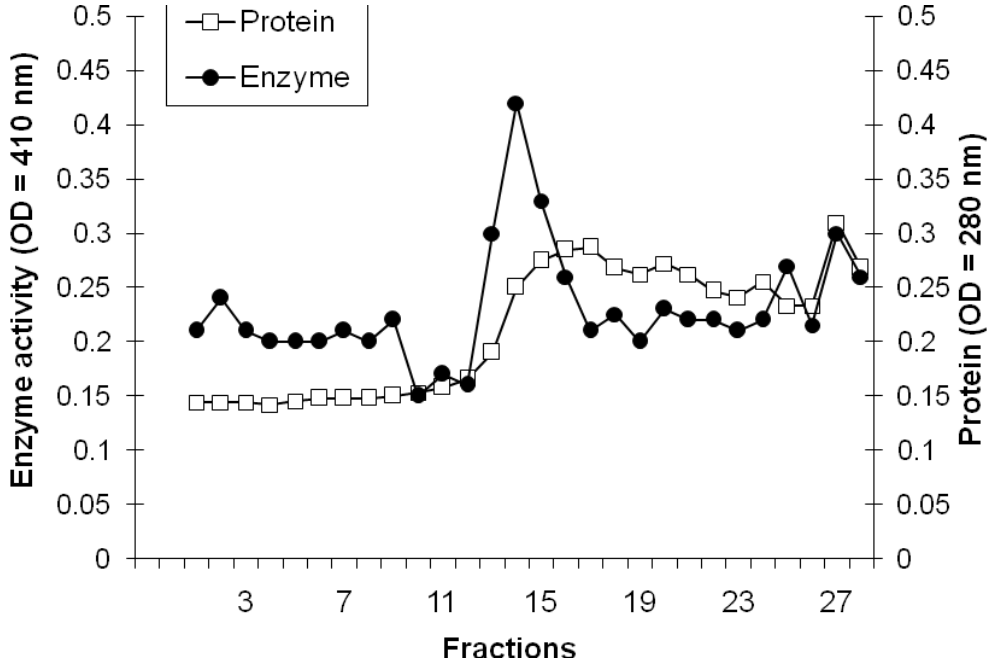
تخلیص آنزیم: برای خالص سازی آنزیم ابتدا سوپ کشت سلول به وسیله غلظت ۵۰ درصد آمونیوم سولفات ته نشین سازی شد و پس از دیالیز، نمونه از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE عبور داده شد (شکل ۵). طبق نتایج به دست آمده خروج پروتئینها از نمونه ۱۱ آغاز شد و فعالیت آنزیمی بین نمونه های ۱۳-۱۶ مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- منحنی Lineweaver-Burk جهت محاسبه K_m و V_{max}.



شکل۵ - کروماتوگرام فرآیند تخلیص آنزیم آسپاراژیناز با استفاده از ستون DEAE سلولز.

نتایج حاصل از مراحل مختلف تخلیص آنزیم با محاسبه فعالیت آنزیم در هر مرحله در جدول ۱ نشان داده شده است. هر واحد آنزیمی مقداری از آنزیم است که یک میکرومول سوبسترا را در ۱ دقیقه به محصول یا یون آمونیوم تبدیل نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مراحل خالص سازی آسپارازیناز

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Total activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)	Fold purification	% Yield
CE (1)	320	0.3	1.6×10^{-3}	0.53	13.88	1	100
AS (2)	4.5	0.36	0.33×10^{-2}	0.015	148.138	10.67	3
IEC (3)	1	0.027	0.53×10^{-3}	0.53×10^{-3}	316.05	22.77	0.1

Steps: (1) Crude extract; (2) ammonium sulfate fractionation; (3) ion exchange chromatography

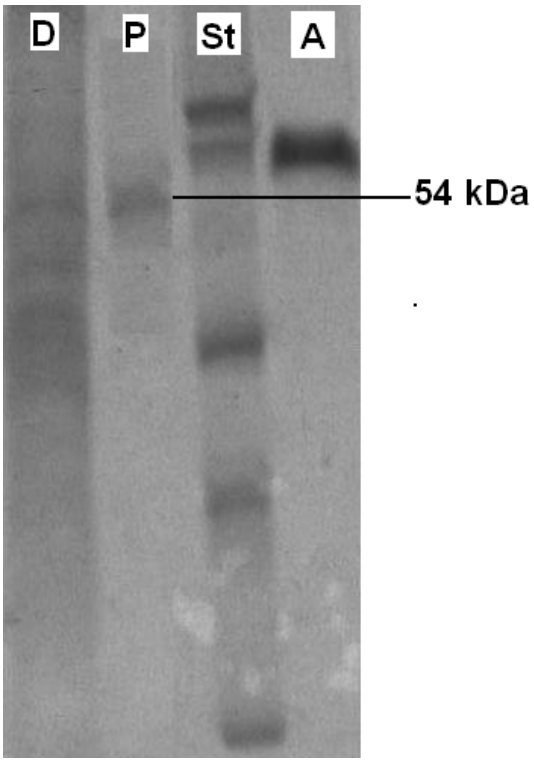
طبق نتایج به دست آمده، خلوص نسبی آنزیم در مرحله رسوب دادن پروتئینها با آمونیوم سولفات به میزان حدود ۱۱ برابر و در مرحله ستون DEAE به میزان حدود ۲۳ برابر می باشد.

الکتروفورز عمودی: نتایج الگوی پروتئینی به دست آمده از خلوص آنزیم آسپاراژیناز با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE در شکل ۶ نشان داده شده است. یک باند مشخص در ناحیه ۵۴ کیلو دالتون مشاهده شد. حضور این باند در نمونه دیالیز شده نیز به چشم خورد. **محاسبه جرم مولکولی تقریبی** آنزیم خالص شده بر اساس فاصله حرکت پروتئینها در ژل انجام شد.

بحث

سراشیا یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، اکسیداز مثبت است و جزء خانواده *Entrobacteriaceae* طبقه بندی می‌شود (۸) که در این تحقیق برای تولید آنزیم در نظر گرفته شد. اگرچه مطالعات گسترده‌ای بر روی جداسازی آنزیم آسپاراژیناز انجام شده است اما اطلاعات اندکی از تحقیقات بر روی این آنزیم که توسط سراشیا تولید می شود در دست می‌باشد.

برای رشد بهینه سراشیا، هوادهی ملایم محیط کشت مورد نیاز است و آسپاراژیناز به مقدار بیشتری در سطوح خیلی پایین اکسیژن تولید می شود (۱۵). در مطالعه حاضر نیز از هوادهی کم برای تولید آنزیم استفاده شد که مقایسه تولید آن با حالت هوادهی زیاد نشان داد که حالت هوادهی ملایم تولید بهینه آنزیم بیشتر است. همچنین در این تحقیق pH بهینه آنزیم ۷ به دست آمد. بنابراین کلیه آزمایشات در pH ۷ انجام شد. برخی گزارشات نشان داده است که در باکتری *Erwinia carotovora* آسپاراژیناز دارای pH بهینه ای در حدود ۸/۶ می باشد (۱۰) .



شکل۶- ژل SDS-PAGE در نمونه خالص شده و دیالیز. نمونه دیالیز (D) ، نمونه آنزیم خالص شده در فراکسیون ۱۴ ستون کروماتوگرافی (P) ، مارکر آلبومین سرم گاوی خالص با وزن ۶۶۲۵۰ (A) ، مارکر پروتئینی (St) با وزن مولکولی سیتوکروم C ۱۳/۲، میوگلوبین با وزن ۱۷,۲ ، اوالبومین ۴۵، آلبومین ۶۶,۲ ، اووترانسفرین ۷۶ کیلو دالتون.

www.SID.ir

Archive of SID

تخلیص آنزیم آسپاراژیناز از میکروارگانیسمهای مختلف انجام شده است. از جمله آنها می توان *Escherichia coli* , *glutaminasificans*, *Erwinia carotovora*, *Acinetobacter* را نام برد (۱، ۶ و ۱۵). تقریباً در تمامی گزارشات اندازه آنزیم مشابه اعلام شده است. به طوری که با استفاده از روشهای الکتروفورز روی ژل آکریلامید و نیز توسط روش ته نشین سازی تعادلی جرم مولکولی آنزیم در حدود kDa ۱۸۰– تعیین شد و در باکتری *Erwinia carotovora* وزن آن در حدود kDa ۱۳۵ تخمین زده شد(۵). این آنزیم بعد از تیمار با سدیم دودسیل سولفات و اوره در الکتروفورز زیر واحد هایی جرم مولکولی kDa ۳۲/۵ را نشان داد (۵). طبق این داده‌ها، در بعضی از باکتریها آنزیم دارای پنج یا شش زیرواحد kDa ۳۲ و در برخی دیگر مثل *E. coli* دارای ۴ زیر واحد kDa ۳۲ است (۶).

در مطالعه حاضر آنزیم خالص شده تنها یک باند در ژل الکتروفورز SDS-PAGE تولید نمود که این باند در ناحیه حدودkDa ۵۴ است. این نتیجه با گزارشات قبلی که اندازه آنزیم را در *Serratia* حدود kDa ۳۱/۵ اعلام کرده، مطابقتی ندارد (۱۸). با توجه به اینکه در این پژوهش برای اولین بار، از محیط کشت حاوی عصاره مالت و پپتون برای تولید آنزیم استفاده شد، پیشنهاد می شود که در این محیط باکتری یک ایزوآنزیمی تولید نموده است که از لحاظ وزن مولکولی با آنچه تاکنون گزارش شده است متفاوت است. بعضی از مطالعات اخیر وزن ملوکولی آنزیم را در نوعی باسیلوس استخراج شده از خاک حدود kDa ۴۵ (۱۲) و در *Streptomyces gulbargensis* kDa ۸۲ نیز گزارش کرده اند (۲).

میزان فعالیت ویژه آنزیم در سوپرناتانت (mg protein / units) ۱۳/۸۸و در آنزیم با خلوص نسبی حدود mg (units/protein) ۳۱۶/۰۵ محاسبه شد. همچنین فاکتور های کینتیکی در این آنزیم برای اولین بار در این پژوهش محاسبه شد، به طوری که K_m آنزیم در حدود mM ۰/۱۸ و مقدار V_{max} آن در حدود mM/min ۱۲/۵ محاسبه شد.

با توجه به اینکه این آنزیم در درمان برخی از سرطانها به ویژه لوسمی مورد استفاده می باشد، خالص سازی این آنزیم و مشخص کردن فاکتورهای کینتیکی در استفاده از آن برای درمان بیماریها دارای اهمیت است که در این تحقیق به خوبی مشخص گردید.

منابع

1- 6- Pieters R, Carroll WL. (2008) Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Pediatr. Clin. North. Am. 55:1–20

2- Agarwal A, Kumar S, Veeranki V, (2011) Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. Lett. Appl.Microbiol 10: 1111

3- Amena S., Vishalakshi N., Prabhakar M., Dayanand A., Lingappa K., (2010) Production, purification and characterisation of L-asparaginase *Streptomyces gulbargensis*. Braz. J. Microbiol. 41, 173-178

4- Avramis VI, Tiwari PN. (2006) Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Int. J. Nanomedicine. 1:241–254.

5- Broome J. (1961) Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. Nature. 191, 1114–1115.

6- Cammack KA., Marlborough DI., Miller DS., (1972) Physical Properties and Subunit Structure of L-Asparaginase Isolated from *Erwinia carotovora*. Biochem. J. 126, 361-379

7- Campbell H, Mashburn L. (1969) L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. Biochemistry. 9, 3768–3775.

8- Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, rasoul-Amini S, et al (2008) An Optimized Medium for Screening of L-Asparaginase production by Escherichia coli. Am. J. Biochem. Biotechnol: 4 , 422-424.

www.SID.ir

Archive of SID

9- Hejazi A., Falkiner FR., (1997) *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. 46, 903-912

10- Jha SK, Pasrija D, Sinha RT, Singh HR, Nigam VK, Vidyarthi AS, (2012) Microbial L-Asparaginase: A review on current scenario and future prospects. Int. J. Pharmaceut. Sci. Res, 3: 3076-3090

11- Kamble VP., Rao RS., Borkar PS., Khobragade CN., Dawane BS. (2006) Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine dereivitive on some of its kinetic parameters. Ind. J. Biochem. Biophys. 43, 391-394

12- Kidd J. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. J. Exp. Med. 98, 565–582.

13- Moorthy V., Ramalingam A., Sumantha A., Shankaranaya R.T., (2010) Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. Afri. J. Microbiol. Res. 4, 1862-1867.

14- Peterson RE, Ciegler A, (1969) L-Asparaginase Production by Various Bacteria. Appl. Microbiol, 17,. 929-930

15- Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, et al, (2011) L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. Cancer. 117, 238–249.

16- Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. N. Engl. J. Med. 360:2730–2741

17- Robyt JF., White BJ. (1987) Biochemical techniques theory and practice. Brooks/Cole Pub Company USA p. 391.

18- Stern ML., Phillips AW., Gottlieb AJ., (1976) Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens.* J. Bacteriol. 125, 719–727.

Purification and determination of kinetics parameters of asparaginase from *Serratia marcescens*

Abkhoei L., Minai-Tehrani D., Eftekhar F., Karaji N., Mirfakhar F. and Vaziritabar N.

Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Asparaginase is a hydrolytic enzyme that catalyses asparagine to aspartic acid and ammonia. The enzyme is used for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), lymphoma and melanolymphoma. *S. marcescens* is a Gram-negative bacterium with red pigment that can produce asparaginase in culture medium culture in the presence of asparagine. In this study asparaginase was purified and kinetic parameters of enzyme were determined. A modified culture medium was used for enzyme production containing malt extract, soy peptone and asparagine. Enzyme activity was detected after 8 hours and maximum enzyme activity was reached after 40-44 hours of incubation. Purification of the enzyme was carried out using ammonium sulfate precipitation. The concentrated enzyme preparation was loaded onto DEAE cellulose chromatography column. The SDS-PAGE was determined a single band with about 54 kDa protein. The optimum pH and temperature of enzyme activity were determined to be about 7 and 40˚C respectively, and the kinetic parameters such as K_m and V_{max} were measured for the first time in this study.

Key words: Enzyme, Asparaginase, *Serratia marcescens*, Purification, Kinetic parameters.

www.SID.ir