

مطالعه و ارزیابی کلون کردن ژن آنزیم L-آسپاراژیناز II *Escherichia coli* 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 به صورت تجاری به عنوان 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-آسپاراتات و آمونیم تبدیل می‌شود که در نهایت به تخریب سلول‌های سرطانی منجر می‌شود. هدف از این پژوهش، کلون کردن ژن ال-آسپاراژیناز II در *E. coli* و جهت تولید انبوه این آنزیم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: ژن ال-آسپاراژیناز II (ansB) با روش PCR از *E. coli* BL21 جدا گردید. قطعه تکثیر یافته و شاتل وکتور بیانی pMR12 توسط آنزیم‌های BamHI، HindIII، هضم شد. واکنش اتصال بین قطعه‌ی PCR و شاتل وکتور بیانی برش خورده با روش استاندارد انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد، وکتور نو ترکیب با روش شوک با CaCl_2 سرد به *E. coli* JM101 ترانسفورم شد. در نهایت به میزبان *B. subtilis* با روش شیمیایی انتقال یافت.

یافته‌ها: در این مطالعه، ژن ansB به وسیله PCR از *E. coli* BL21 جدا و توسط تجزیه و تحلیل آنزیمی محصول PCR تأیید گردید و در شاتل وکتور بیانی pMR12 کلون شد. سپس وکتور نو ترکیب 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 به صورت 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 (E.C.3.5.1.1 amidohydrolase) در درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد به‌کار می‌رود (۲۱). این

نویسنده مسئول: حمید حسینیان

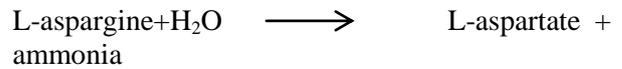
پست الکترونیکی: Hamid.hos83@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۵/۲۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۲

آنزیم L- اسپارژین را دامینه کرده و به ال-آسپاراتات و آمونیوم هیدرولیز می‌کند (۱،۳،۲).

L-asparaginase



ال - اسپارژیناز 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 اشريشیاکولی فعالیت اسپارژینازی از خود نشان داده و ال-اسپارژیناز 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-اسپارژیناز نوع I (*ansA*) سیتوپلاسمی بوده و میل ترکیبی پائینی برای اسپارژین دارد و به عنوان آنزیم درون سلولی مطرح می‌شود؛ در حالی که نوع II (*ansB*) پری پلاسمی بوده و میل ترکیبی بالایی برای اسپارژین دارد و در پاسخ به کمبود نیتروژن ترشح می‌شود. ال-اسپارژیناز نوع II برخلاف نوع I در شرایط بی‌هوازی بیان می‌شود و دارای ویژگی ضدتوموری بالایی است (۲۷،۱۵،۶). بیشترین فعالیت ال-اسپارژیناز 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 اسپارژین در درون سیتوپلاسم خود هستند. از این رو، این سلول‌ها اسپارژین مورد نیاز جهت سنتز پروتئین‌ها را از سرم خون خود تأمین می‌کنند. در مقابل، سلول‌های طبیعی قادر به سنتز اسپارژین در سیتوپلاسم خود هستند. دلیل استفاده از اسپارژیناز در مبارزه با سرطان خون نیز همین تفاوت بنیادی بین سلول‌های سرطانی و طبیعی است. هنگام تزریق اسپارژیناز، میزان اسپارژین سرم کاهش یافته و سلول‌های سرطانی در شرایط کمبود اسپارژین قرار می‌گیرند که در این صورت رشد سلول‌های سرطانی متوقف شده و یا حتی منجر به مرگ آن می‌شود (۲۵،۱۷،۶).

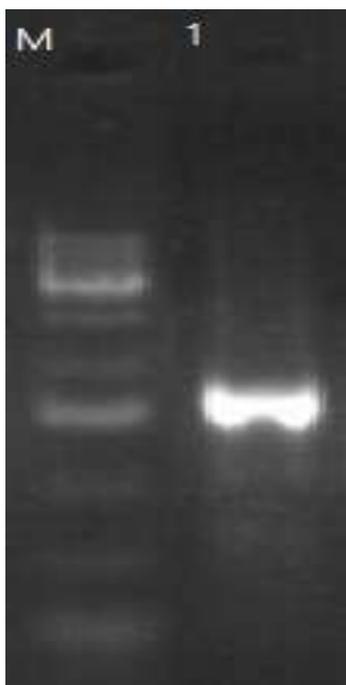
از فاکتورهای محدودکننده در درمان با ال-اسپارژیناز، حساسیت بالا است که محدوده آن از واکنش‌های آلرژیک ملایم تا شوک آنافیلاکتیک می‌باشد (۱۳،۹). هم‌چنین

بسیاری از آنزیم‌های کلاس II هیدرولیز کننده ال-اسپارژین 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-اسپارژیناز تمایل بیشتری برای هیدرولیز ال-اسپارژین نسبت به ال - گلوتامین را دارند (۲۶،۲۱). هدف این پژوهش کلون کردن ژن آنزیم ال-اسپارژیناز (*ansB*) از *E. coli* BL21 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. coli* BL21 و *E. coli* JM101 تهیه شده از کلکسیون میکروبی انیستیتو پاستور ایران استفاده گردید. سویه *E. 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-عمل 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 3' و پرایمر R با ترادفبازی 5' gga tcc TTA GTA CTG ATT GAA GAT 3' (۲۷bp) طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید. پرایمر F دارای جایگاه برش برای آنزیم HindIII 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، طولیل شدن در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه

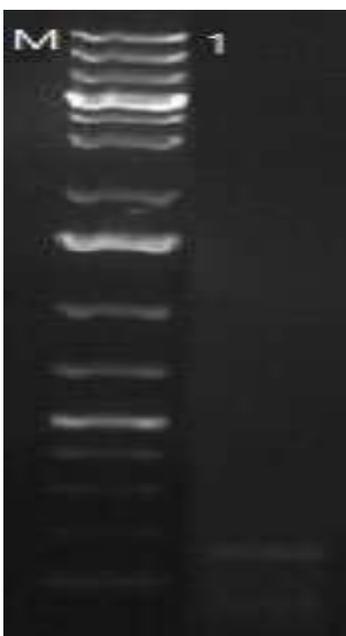
به نتایج حاصل از واکنش‌های هضم، ژن در ۲ نمونه به صورت صحیح داخل شاتل وکتور بیانی pMR12 قرار گرفته است.



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 PstI

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 (United States, Korea, Enzymomics BamHI) های Fermentas HindIII FastDigest) شاتل وکتور بیانی pMR12 و محصول PCR را برش داده و توسط آنزیم (Korea) (Ligation) T4 DNA Ligase (Enzymomics, PCR و شاتل وکتور بیانی 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. coli* JM101 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 (Optimized Transformation 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

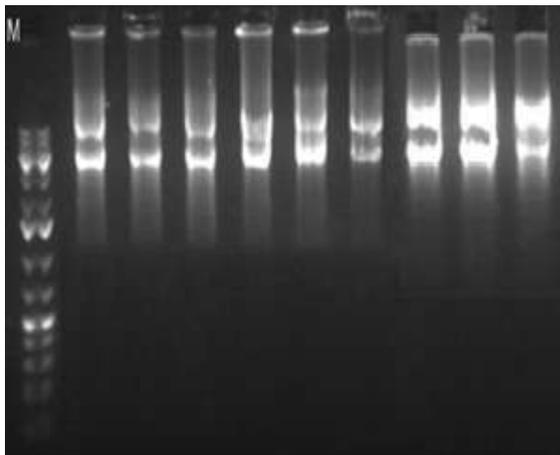
کلون کردن ژن *ansB* در *E. coli* JM101. بعد از جداسازی DNA کامل باکتری *E. coli* BL21، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، PCR انجام شد و باند ۱kb (شکل ۱) به دست آمد. با هضم محصول PCR توسط آنزیم PstI دو باند ۰/۴kb و ۰/۲kb حاصل شده است (شکل ۲). بر اساس نمودار ژن (شکل ۳) و باندهای حاصله، محصول PCR را تأیید 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 HindIII، BamHI به‌طور هم‌زمان گذاشته شد و نمونه‌ها الکتروفورز گردیدند (شکل ۴). با توجه

۱: هضم نمونه ۱ با آنزیم‌های BamHI, HindIII

M: مارکر (1Kb DNA ladder)

۲: هضم نمونه ۲ با آنزیم‌های BamHI, HindIII

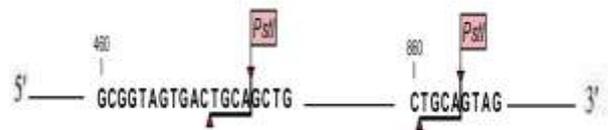
کلون کردن ژن *ansB* در *B. subtilis*. پلاسمید نوترکیب با روش شیمیایی به *B. subtilis* WB600 ترانسفورم شد. پس از ۱۸ ساعت تعداد ۹ کلنی بر روی محیط رشد کردند. از تمام نمونه‌ها استخراج پلاسمید صورت گرفت و با باند شاتل وکتور بیانی pMR12 دارای ژن *ansB* به صورت صحیح، مقایسه شدند (شکل ۵).



شکل ۵. نمونه‌های پلاسمیدی استخراج یافته از ۹ کلنی و یک پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل مثبت در کنار مارکر قرار دارد.

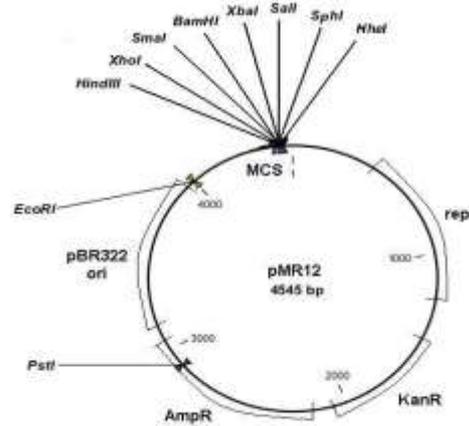
بحث

تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز به صورت 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) جدا گردیده 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 به کار 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 ترشح مقادیر زیاد پروتئین به داخل محیط کشت



ansB

a

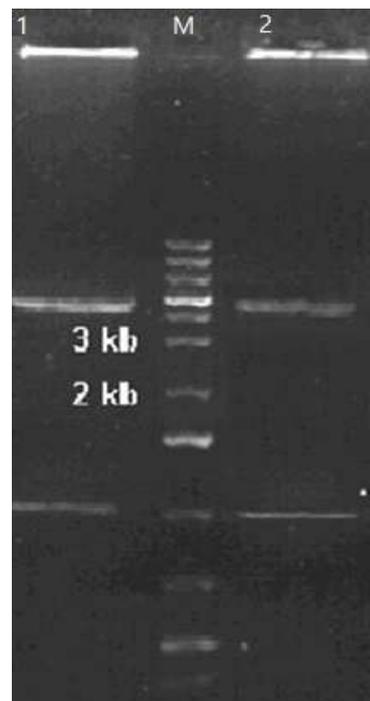


b

شکل ۳. نمودار ژن *ansB*، پلاسمید pMR12

a. نمودار ژن *ansB*: ژن *ansB* با اندازه ۱۰۴۷bp که جایگاه *PstI* در دو ناحیه ژن قرار دارد که این ژن را به سه قسمت تبدیل می‌کند و جایگاه‌های *HindIII*, *BamHI* بر روی ژن قرار گرفته‌اند.

b. نقشه ژنتیکی ناقل بیان کننده pMR12



شکل ۴. واکنش هضم آنزیمی پلاسمید

آنزیم ال-آسپاراژیناز II در درمان مولکولی لوکمی، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشته است. در حال حاضر این آنزیم از باکتری‌های *E. coli* جداسازی و به صورت تجاری به عنوان داروی ضدسرطان (لوکمی لنفوبلاستیک حاد) تولید می‌شود. بنابراین نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای ایجاد میزبان نو ترکیب با قابلیت بیان بالای ال-آسپاراژیناز II، می‌تواند 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.

(تولید ۶۰٪ از پروتئین‌های تجاری توسط *B. subtilis*) و داشتن اطلاعات کافی به منظور رونویسی، ترجمه و ایجاد ساختار سه بعدی پروتئین و در پی آن مکانیسم‌های ترشحی به عنوان یک میزبان خوب برای کلون و بیان ژن محسوب می‌شود. برای کلون کردن ژن در *B. subtilis*، تعداد زیادی از وکتورها ساخته شده‌اند (۱۲،۱۰). در برخی موارد به دلیل 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 نو ترکیب را به *B. subtilis* انتقال داده شود (۲۰). سیگنال پپتید ژن آسپاراژیناز *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.

منابع

- (1) Abakumova L, Podobed O. Antitumor activity of L asparaginase from *Yersinia pseudocolicis*. *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. coli* their separation, purification and anti tumor activity. *J Biochem*, 1967;6:721-726.
- (8) Corena CP, Lupescu I, Vatafu I, Caraiani T, Savoie 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) Ebrahimezhad 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". *Biootechnol*, 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* asparaginase II 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 *Escherichia coli* TOP10 under control of *Bacillus subtilis* AQ1 endoxylanase promoter in *Escherichia coli* DH5A and *Bacillus subtilis* DB104. 2012.
- (15) Huser A, Kloppner U, Rohm K. Cloning, sequence analysis, and expression of ansB from *Pseudomonas fluorescens*, 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 calcoaceticus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973;48:35-40.
- (17) Kozak M, Jurgab S. A comparison between the crystal and solution structures of *E. coli* asparaginase II. *Acta Biochem Pol*, 2002;49:509-513.
- (18) Lee B, Yang H. Crystallographic 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. coli* secY. *J Biochem*, 1990;107:603-607.

- (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) Sambrook 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 filamentous 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) Vidyal J, Vasudevan UM, Socco CR, Pandey A. Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 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. coli* W3110. *Asian J. Biochem*, 2008;3(6):337-350.