مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۲

Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی مولکولی *باسیلوس*های تولید کننده آنزیم ضد سرطان ال-آسپاراژیناز خارج سلولی از خاک

علی ناظمی[۱]، سعید غلامیان*[۲]، میر ساعد میری نرگسی[۳]

[۱] استادیار، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
[۳] عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم آسپاراژیناز نقش مهمی در درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد ایفا می‌کند. این آنزیم به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی نئوپلاستیک، در فرایند شیمی‌درمانی حائز اهمیت می‌باشد. هدف این تحقیق، جستجو و معرفی آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز خارج سلولی تولید شده توسط جنس *باسیلوس* می‌باشد که بطور بالقوه می‌توانند خصوصیات سرولوژیک مطلوب‌تر و عوارض جانبی کمتری نسبت به انواع تجاری رایج داشته باشند.

مواد و روش‌ها: گونه‌های *باسیلوس* جدا شده از خاک‌های غنی از پروتئین، در محیط کشت M۹ تغییر یافته کشت داده شدند. کلنی‌های تولید کننده‌ی آنزیم مورد نظر، بر اساس تغییر رنگ محیط متمایز گردیدند. سپس آنزیم تولید شده، خالص سازی گشته و میزان فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین وزن مولکولی آنزیم اندازه‌گیری شد. *باسیلوس*های تولید کننده آنزیمِ دارای فعالیت مطلوب، با روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: سویه‌های جدید *باسیلوس* تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز شناسایی گشته و خصوصیات کلی آنزیم‌های استخراجی مطالعه گردید.

نتیجه‌گیری: از آنجا که ال- آسپاراژیناز جدا شده از باکتری‌های مختلف دارای اثرات ضد سرطانی متفاوتی بوده است، جستجو برای یافتن میکروارگانیسم‌های تولید کننده این آنزیم، یکی از راه‌های اصلی جهت دستیابی به آنزیمی با خصوصیات درمانی ایده‌آل می‌باشد.

کلمات کلیدی: L-asparaginase، *باسیلوس*، سرطان، لوسمی.

مقدمه

ال-آسپاراژیناز آنزیمی است که در طبیعت توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردد و اسید آمینه ال-آسپاراژین را به دو جزء آسپارتیک اسید و آمونیاک می‌شکند (۱۴). اسید آمینه ال-آسپاراژین برای حیات سلول‌ها ضروری می‌باشد. از آنجا که سلول‌های توموری قادر به تولید این اسید آمینه نمی‌باشند، می‌بایست آن را از محیط اطراف خود دریافت نمایند. بنابراین چنانچه آنزیم ال-آسپاراژیناز در محیط حضور داشته باشد، با کاهش میزان ال-آسپاراژین، باعث مرگ سلول‌های توموری می‌شود، بطور انتخابی از بین خواهند رفت بدون اینکه به سلول‌های سالم آسیب وارد گردد. از این رو آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان یک عامل موثر در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). خصوصیت ضد سرطانی این آنزیم در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود معطوف ساخته است. علاوه بر این، آنزیم آسپاراژیناز در صنعت فرآوری مواد غذایی نیز برای تامین معیارهای مرتبط با سلامت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). باکتری‌ها از اصلی‌ترین منابع تولید آنزیم به شمار می‌روند. در این میان جنس *باسیلوس* از نظر تولید مقادیر فراوانی از آنزیم‌های خارج سلولی شاخص می‌باشد.

آدرس نویسنده مسئول : گروه میکروبیولوژی -دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
Email : saeedghmail@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۹

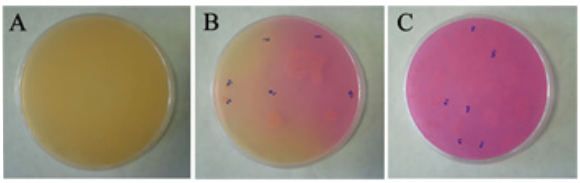
در این تحقیق باکتری‌های *باسیلوس* جدا شده از خاک‌های غنی از پروتئین از نظر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز خارج سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

به منظور جمع آوری باکتری‌های تولید کننده ال-آسپاراژیناز، نمونه‌گیری از خاک‌های مناطقی که غنی از منبع پروتئین بودند انجام پذیرفت. از جمله این مناطق می‌توان به مسیر عبور پساب بازارهای سنتی فروش ماهی و تصفیه‌خانه کشتارگاه‌های مرغ اشاره کرد. نمونه‌گیری در فصل زمستان و طی دو مرحله از نواحی غربی استان مازندران انجام پذیرفت. جهت بررسی حضور باکتری‌های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز، از روش غربالگری سریع در پلیت (۸) با تغییرات جزئی استفاده شد. بدین منظور بعد از تیمار حرارتی نمونه‌ها (برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ °C)، از آنها در محیط «M۹ تغییر یافته» کشت تهیه شد. جهت تهیه محیط کشت، محلول شماره ۱ با ترکیب ۰.۲ ۰.۱M CaCl۲.۲H۲O ،۰.۴ ml ۱M MgSO۴.۷H۲O ml، ۲۰٪ Glucose ml ۲، ۲.۵٪ Phenol red ml ۰.۶، Agar ۴ gr با استفاده از محلول شماره ۲ در حجم ۵۰۰ ml با ترکیب ۰.۲۵ gr NaCl ،۱.۵ gr KH۲PO۴ ،۳ gr Na۲HPO۴.۲H۲O، ۲.۵ gr L-asparagine به حجم ۲۰۰ ml و pH ۷ رسانده شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C، کلنی‌های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز با تغییر رنگ محیط اطراف خود از زرد به صورتی، از سایر کلنی‌ها متمایز شده و به منظور تهیه کلنی تک، از آنها کشت مجدد تهیه شد. جهت شناسایی ۵ باکتری گزینش شده در این تحقیق، از روش مولکولی استفاده گردید (۱۶). به منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (Cat.No.DN۸۱۱۵C) استفاده گردید. PCR با برنامه زمانی ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۹ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه و با استفاده از پرایمرهای ۱۶S rRNA با نام BAc۰۸F ۵'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۳' و ۱۳۹۰R Uni ۵'-GACGGGCGGTGTGTACAA-۳' انجام شد (۱۲). محصولات PCR پس از آنالیز کیفی در ژل آگارز و اطمینان از حضور باند در محدوده‌ی مورد انتظار، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شده و پس از دریافت نتیجه‌ی تعیین توالی، در سایت NCBI مشابهت توالی‌ها با ابزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت و تصویر توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas ۲.۳۳ ثبت گردید. به منظور تغلیظ و رسوب‌دهی آنزیم آسپاراژیناز از روش رسوب‌دهی با استون استفاده شد. برای این منظور طی چند مرحله، درصدهای افزایشی استون به آنزیم افزوده و میزان فعالیت آنزیمی بررسی گردید تا درصدی از استون که بیشترین اثر رسوب‌دهی را بر روی آنزیم داشت مشخص گردد. آنزیم خالص شده برای انجام SDS-PAGE و تعیین فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه کنترل منفی نمونه‌هایی که در SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند، از هر نمونه در محیط M۹ که فاقد اسید آمینه آسپاراژین می‌باشد تلقیح شد. تخمین وزن مولکولی آنزیم، با کمک مارکر پروتئینی شرکت فرمنتاز (Cat.No.SM۰۴۳۱) انجام شد. تعیین فعالیت آنزیمی با تهیه لوله‌های نمونه، شاهد و استاندارد انجام شد. لوله‌های استاندارد حاوی غلظت‌های متفاوتی از سوبسترای استاندارد و نیز شاهد استاندارد بوده و برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. لوله نمونه، حاوی اسید آمینه آسپاراژین بوده و در صورت تولید آسپاراژیناز توسط باکتری‌های مورد بررسی، آمونیاک تولید شده با استفاده از معرف نسلر قابل ارزیابی خواهد بود. پس از افزودن مقادیر لازم، مطابق روش قانع و همکاران؛ ۱۳۸۷، تمام لوله‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه شدند و فعالیت آنزیمی مورد سنجش قرار گرفت.

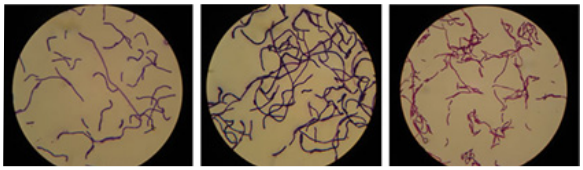
یافته‌ها

در نتیجه‌ی تیمار حرارتی، بار میکروبی خاک بسیار کاهش یافت و فقط باکتری‌هایی که قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز و مصرف آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن بودند توانستند رشد کرده و محیط را به رنگ صورتی در آورند (شکل ۱).



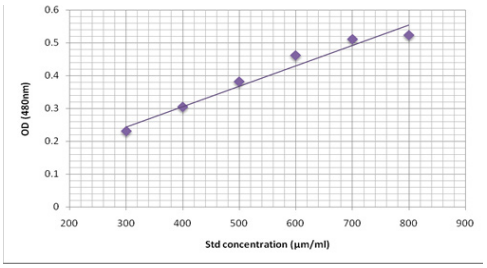
شکل ۱. تغییر رنگ محیط کشت بر اثر تولید آنزیم عدم تولید آنزیم (A) و تولید آنزیم توسط تعدادی از کلنی‌ها (B و C) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

آزمایش رنگ‌آمیزی گرم برای کلنی‌هایی که رنگ محیط را به صورتی تغییر داده بودند انجام شد. اکثر آنها بصورت باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شدند و اسپور بطور واضح در تعدادی از آنها مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲. مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها

کلنی‌هایی که بصورت باسیل گرم مثبت نبودند حذف شدند. در نهایت پس از دو مرحله نمونه‌گیری از مناطق مختلف، تعداد ۱۲ عدد کلنی تولید کننده‌ی ال آسپاراژیناز که برخی از آنها دارای خصوصیات مورفولوژیک از جمله قوام، شفافیت و شکل هندسی- مشابه بودند جداسازی گردید. تمام کلنی‌ها بطور قوی کاتالاز مثبت بودند. میزان جذب نمونه‌ها مطابق قانون بیر- لامبرت محاسبه گردید و با رسم تغییرات جذب در غلظت‌های مختلف نمونه‌های استاندارد، نمودار جذب استاندارد حاصل گردید (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار جذب استاندارد

در نهایت بر اساس این شیب خط، طبق فرمول زیر، غلظت نمونه‌های مجهول محاسبه گردید. نتایج این محاسبات در جدول ۱ نمایش داده شده است.

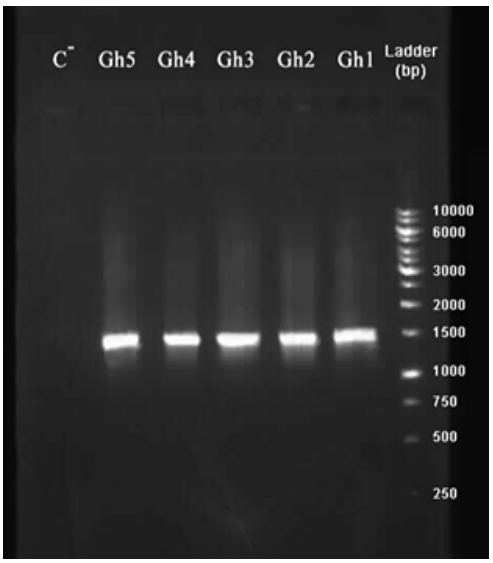
جدول ۱. جذب و Units/ml نمونه‌های Test

نمونه	غلظت‌های محاسبه شده Cs (µm/ml)	جذب در ۴۸۰ nm (OD)	Units/ml
1	643.7	**0.412**	64.37
2	1792.2	**1.147**	179.22
3	815.6	**0.522**	81.56
4	720.3	**0.461**	72.03
5	1404.7	**0.899**	140.47
6	098.4	**0.063**	09.84
7	484.3	**0.310**	48.43
8	653.1	**0.418**	65.31
9	1043.7	**0.668**	104.37
10	709.4	**0.454**	70.94
11	684.4	**0.438**	68.44
12	614.1	**0.393**	61.41

در این مرحله، ۵ باکتری که دارای میزان Units/ml مطلوبی بودند برای ادامه کار انتخاب شدند. برای ارزیابی وزن مولکولی آنزیم‌های مورد نظر، آنزیم استخراج شده از هر باکتری به همراه کنترل منفی آن و یک مارکر پروتئینی در ژل SDS PAGE مورد بررسی قرار گرفت. تمام باند مربوط به آنزیم‌های تمام نمونه‌ها بطور تقریبی در محدوده ۴۳ کیلو دالتون آشکار شد. همانطور که انتظار می‌رفت نمونه‌های کنترل منفی فاقد باند آنزیم بوده و یا نسبت به نمونه‌هایی که برای رشد خود نیاز به تولید آنزیم داشتند، باند بسیار ضعیفی را نشان دادند (شکل ۴).

شکل ۴. ژل SDS-PAGE نمونه‌های زوج، کنترل منفی برای نمونه‌های فرد قبل از خود می‌باشند. برای مثال نمونه ۲، کنترل منفی نمونه ۱ است.

نتایج بررسی محصولات PCR قطعه ۱۶S rDNA در ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵. باندهای ۱۶S rDNA نمونه‌های Gh۱ تا Gh۵

توالی‌های بدست آمده، از نظر همولوژی با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI بررسی شد. در تمام موارد همولوژی کمتر از ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده احتمال جدید بودن سویه‌ها می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج BLAST پنج باکتری تولید کننده ال-آسپاراژیناز

No.	Species	Accession number
Gh1	*Bacillus aryabhattai* 99%	JX035936.1
Gh2	*Bacillus megaterium* 98%	JQ312013.1
Gh3	*Bacillus subtilis* 99%	JN029538.1
Gh4	*Bacillus licheniformis* 98%	EU366371.1
Gh5	*Bacillus amyloliquefaciens* 96%	CP003332.1

بحث

باکتری‌ها منبعی سهل‌الوصول و اقتصادی برای تولید آنزیم‌های مختلف به شمار می‌روند. تحقیقات پیشین گزارشاتی از استخراج آنزیم ال-آسپاراژیناز از باکتری‌های مختلف ارائه داده‌اند که از آن جمله می‌توان به استخراج L-asparaginase II از باکتری *E. coli* (۱)، از *Pseudomonas Aeruginosa* (۷)، از *باسیلوس* (۱۱) و از *Streptomyces noursei* (۶) اشاره کرد. آنزیم آسپاراژیناز در پزشکی به عنوان دارویی موثر جهت درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد (سرطان خون) شناخته می‌شود. این آنزیم، علی‌رغم اینکه در مقایسه با سایر داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی سازگاری بسیار بالایی با بافت و ساز و کارهای حیاتی بدن دارد، اما مانند هر داروی دیگری ممکن است اثرات جانبی نامطلوبی را نشان دهد. گاهی این عوارض جانبی حتی ممکن است جان بیمار را به مخاطره بیاندازد. از این رو محققان در تلاش برای دستیابی به آسپاراژینازی با توان درمانی بالا و عوارض جانبی کم می‌باشند. یک راهکار مقرون به صرفه که در این تحقیق نیز دنبال شده است، جستجو برای یافتن آنزیم‌های آسپاراژیناز جدید موجود در طبیعت است. آنزیم‌های آسپاراژینازی که از میکروارگانیسم‌های مختلف بدست آمده است دارای خصوصیات درمانی و عوارض جانبی متفاوتی هستند. از این رو محققان با امید دست‌یابی به آنزیم‌های مطلوب‌تر، علاوه بر بهبود آنزیم‌های موجود با روش‌هایی همچون مهندسی پروتئین (۵، ۱۰)، به جستجو برای یافتن میکروارگانیسم‌های مختلف تولید کننده این آنزیم نیز پرداخته و در این مسیر به نتایج ارزشمندی دست یافته‌اند (۱۵، ۱۳، ۱۱، ۷، ۶، ۳، ۲). در این تحقیق، جنس *باسیلوس* جهت مطالعه انتخاب گردید. جنس *باسیلوس* از نظر تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های خارج سلولی شاخص می‌باشد. از سوی دیگری تحقیقات پیشین تولید آنزیم آسپاراژیناز خارج سلولی توسط سویه‌های *باسیلوس* را به اثبات رسانده است (۱۵، ۱۱، ۸). گونه‌های *باسیلوس* به فراوانی در طبیعت یافت می‌شوند و کشت آنها سریع، آسان و ارزان می‌باشد. از این رو چنانچه آنزیم مطلوب در این باکتری یافت شود، استفاده از آن در صنعت مقرون به صرفه بوده و در پزشکی می‌تواند کاندید مناسبی برای جایگزینی بجای داروهای آسپارازیناز فعلی باشد. آنزیم‌های آسپاراژیناز تولید شده توسط *باسیلوس*‌های شناسایی شده در این تحقیق، ممکن است نسبت به داروهای آسپاراژیناز رایج، دارای خصوصیات سرولوژیک برتر و عوارض جانبی کمتری باشند. لذا به منظور اطلاع از خصوصیات سایتوتاکسیک آنها، پیشنهاد می‌شود اثر این آنزیم‌ها بر کشت سلول مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

(۱) قانع م, بمبئی ب، قانع م. غربالگری سویه های باکتری اشرشیاکلی جهت تولید آنزیم آسپاراژیناز II. فصلنامه علمی- پژوهشی «دانش زیستی ایران». ۱۳۸۷؛ ۴: ۵۶-۴۹.

(2) 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: 173-178.
(3) Basha N, Rekha R, Komala M, Ruby S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from Marine Actinomycetes by Solid-state and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2009; 8(4): 353-360.
(4) Broome J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. The Journal of experimental medicine, 1963; 118(1): 99–120.
(5) Cantor JR, Panayiotou V, Agnello G, Georgiou G, Stone EM. Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. Methods Enzymol, 2012; 502: 291-319.
(6) Dharmaraj, Selvakumar. Study of L-asparaginase production by Streptomyces noursei MTCC 10469, isolated from marine sponge Callyspongia diffusa. Iranian journal of biotechnology, 2011; 9(2): 102-108.
(7) El-Bessoumy A, Sarhan M, Jehan. Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from Pseudomonas Aeruginosa 50071 Using Solid-state Fermentation. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004; 37(4): 387-393.
(8) Gulati R, Saxena R.K, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginage producing micro-organisms. Letters in applied microbiology, 1997; 24(1): 23-26.
(9) Kornbrust B.A, Stringer M.A, Lange N.K, Hendriksen H.V. Asparaginase – an enzyme for acrylamide reduction in food products. Enzymes in Food Technology, 2010; 2: 59-87.
(10) Ln R, Doble M, Rekha V, Pulicherla K. In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol, 2011; 3(8): 617-21.
(11) Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya R. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of Bacillus sp. African Journal of Microbiology Research, 2010, 1862-1867.
(12) Mariam Siala, Benoit Jaulhac, Radhouane Gdoura, Jean Sibilia, Hela Fourati, Mohamed Younes, Sofien Baklouti, Naceur Bargaoui, Slaheddine Sellami, Abir Znazen, Cathy Barthel, Elody Collin, Adnane Hammami and Abdelghani Sghir. Analysis of bacterial DNA in synovial tissue of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis by broad-range PCR, cloning and sequencing. Arthritis Research & Therapy, 2008; 10: 1-14.
(13) Prakasham R, Rao Ch, Subba Rao R, Lakshmi G, Sarma P.N. L-asparaginase production by isolated Staphylococcus sp. – 6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. Journal of Applied Microbiology, 2007; 102: 1382–1391.
(14) Rossi S, Australian Medicines Handbook 2011, Adelaide: Australian Medicines Handbook Pty Ltd. 2011.
(15) Sunitha M, Ellaiah P, Devi R. Screening and optimization of nutrients for L-asparaginase production by Bacillus cereus MNTG-7 in SmF by plackett-burmann design. African Journal of Microbiology Research, 2010; 4(4): 297-303.
(16) Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D16 .S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol, 1991; 173(2): 697-703.