



## کلون سازی و بیان سیتوپلاسمی L- اسپاراژیناز II در باکتری اشیریشیا کلی

حسین مهبودی<sup>۱</sup>، منصور عباچی<sup>۲</sup>، شهرام عراقی<sup>۲</sup>، دکتر هاله حامدی فر<sup>۳</sup>، دکتر بهروز وزیری<sup>۴</sup>، دکتر فریدون مهبودی<sup>۵\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، <sup>۲</sup> کارشناس ارشد، بخش تحقیق و توسعه، شرکت تحقیقاتی تولیدی سینازن، <sup>۳</sup> استادیار، بخش تحقیق و توسعه، شرکت تحقیقاتی تولیدی سینازن، <sup>۴</sup> استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پروتئین نوترکیب، انستیتو پاستور ایران

### چکیده

سابقه و هدف: ال- اسپاراژیناز (تیپ II) با فعالیت ضدتوموری به طور طبیعی توسط باکتری اشیریشیا کلی تولید می گردد. این آنزیم با تبدیل ال- اسپاراژین موجود در خون به آمونیوم و اسپارتیک اسید، در درمان لوکمای لمفوبلاستیک حاد (ALL) مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این پژوهش، تولید سیتوپلاسمی آنزیم ال- اسپاراژیناز II و کلون سازی ژن آن بدون سیگنال پپتید و حذف متیونین ابتدایی بود. مواد و روش ها: در ابتدا ژن ال- اسپاراژیناز II با روش PCR از اشیریشیا کلی سویه K12 جداسازی و درون وکتور بیانی pET32 مهندسی شده کلون گردید. توالی یابی و ارزیابی بیان ژن مورد نظر مطابق با روش های متداول به انجام رسیدند. سپس پلاسمید نوترکیب حاوی ژن متیونین آمینوپپتیداز خالص سازی گردید و با روش شوک حرارتی به درون باکتری تولید کننده اسپاراژیناز نوترکیب انتقال داده شد. یافته ها: بیان ال- اسپاراژیناز سیتوپلاسمی بیش از نوع پری پلاسمی بود. همچنین با توجه به بیان بالای آنزیم متیونین آمینوپپتیداز در میزبان بیانی اشیریشیا کلی Origami، مشخص شد که این آنزیم به طور مؤثری توانسته موجب حذف متیونین ابتدایی ال- اسپاراژیناز شود. نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای معرفی میزبان با قابلیت بیان بالای ال- اسپاراژیناز نوترکیب در سیتوپلاسم، می تواند گامی بزرگ در مسیر درمان لوکمی لنفوبلاستیک حاد و نیز افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب گردد.

واژگان کلیدی: ال- اسپاراژیناز II، اشیریشیا کلی، کلون سازی، بیان ژن

پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۸۹

دریافت مقاله: دی ۱۳۸۸

### مقدمه

زیاد به سویسترای ال- اسپاراژین ( $k_m = 10^{-5} m$ ) و وابستگی سلول های توموری خاص به ذخیره ال- اسپاراژین خارج سلولی می باشد (۴ و ۶). با وجود استفاده گسترده از ال- اسپاراژیناز، اما اثرات جانبی زیادی نیز به دلیل استفاده از آن در درمان بیماران گزارش شده است. از آن جمله می توان به مسمومیت، تخریب کبد، دیابت، لوکوپنی، حمله قلبی یا مغزی، بی نظمی های انعقادی، ترومبوزیس درون جمجمه ای و هموراژی اشاره نمود (۷). بررسی ها نشان داده که اسپاراژیناز نوع دوم دارای خاصیت ضدتوموری بالاتری نسبت به نوع اول است. همچنین در مطالعات

آنزیم ال- اسپاراژیناز یک آمیدوهیدرولاز است که با دامیناسیون ال- اسپاراژین آن را به ال- اسپاراتات و آمونیوم تبدیل می نماید. سویسترا و محصول این واکنش آنزیمی، هر دو نقش مهمی در فرآیندهای متابولیکی موجودات زنده، از باکتری ها تا پستانداران ایفا می نمایند (۱-۴). آنزیم اسپاراژیناز به وسیله میکروارگانیسم های مختلفی ساخته می شود (۵). دلیل فعالیت ضدتوموری آنزیم، تمایل

\* آدرس برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پروتئین نوترکیب  
تلفن: ۴۱۱۸ ۱۳۷ ۹۱۲

باکتری های دیگر می باشند. مطالعه حاضر با هدف تولید سیتوپلاسمی آنزیم ال-آسپاراژیناز II و کلون سازی ژن آن بدون سیگنال پپتید و حذف متیونین ابتدایی انجام شد.

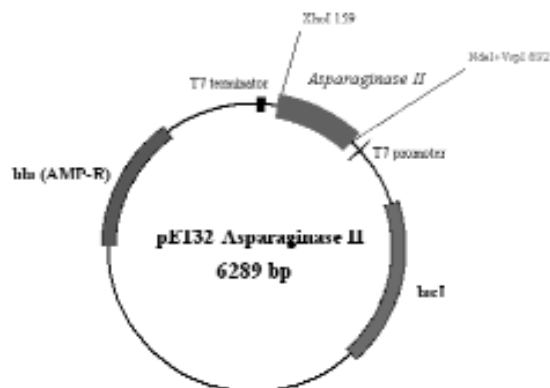
## مواد و روش ها

الف) تکثیر و جداسازی ژن ال-آسپاراژیناز II: در ابتدا اشریشیا کلی K12 سویه Origami در محیط LB broth کشت داده شد. سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت فرمنتاز (ساخت کشور لیتوانی) استخراج گردید. برای تکثیر ژن آسپاراژیناز II از تکنیک PCR و پرایمرهای '5'-GCGATTAATATGCAGATGAGTCTG-3' F: و '5'-ATACTCGAGTCACTGTGTGGCAACG-3' R: (شرکت سیناژن) استفاده گردید. پرایمر پیشرو دارای جایگاه برش برای آنزیم *VspI* و پرایمر پیرو دارای جایگاه برش برای آنزیم *XhoI* (نقاط علامت گذاری شده) بود. به منظور افزایش بیان ژن آسپاراژیناز II در سیتوپلاسم، پرایمرها به گونه ای طراحی شدند که در واکنش PCR توالی مربوط به سیگنال پپتید پروتئین به همراه ژن آسپاراژیناز تکثیر نگردد (۱۱). آنالیز و طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار Gene runner 3.05 صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۳۰ میکرولیتر PCR mix، ۲ واحد آنزیم DNA پلی مرز *Pfu* (شرکت سیناژن)، یک میکرولیتر از هر پرایمر و یک میکرولیتر از نمونه DNA الگو انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله نور UV مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

ب) تهیه پلاسمید نوترکیب: در ابتدا ژن استاندارد دارویی (سکانس ارائه شده در سایت بانک دارویی) تکثیر شده به وسیله واکنش PCR با استفاده از آنزیم لیگاز *T4* باکتریایی در وکتور بیانی *pET-32-a*

کریستالوگرافی و آنالیز همولوژی توالی مشخص شده است که آسپاراژیناز تیپ II، دارای دو بنیان آمینو اسیدی حاوی ترئونین بسیار حفاظت شده می باشد. مطالعات مختلف نشان داده که این نواحی بیشتر در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته است (۵). امروزه به طور وسیعی از داروی آسپاراژیناز II نوترکیب برای درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد (ALL) استفاده می شود. در این بیماری سلول های لنفوسیتی سرطانی به دلیل نقص در ژن آسپاراژین سنتتاز توانایی تولید آسپاراژین مورد نیاز خود را به طور کامل ندارد و از این نظر وابسته به آسپاراژین موجود در خون می باشند. در صورت درمان با آسپاراژیناز، اسید آمینه آسپاراژین موجود در خون به اسیدآسپارتیک و یون های آمونیوم تجزیه می شود. بنابراین سلول های سرطانی به دلیل کمبود آسپاراژین مورد نیاز برای رشد و تکثیر دچار مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) می گردند (۸). همچنین ال-آسپاراژیناز نوترکیب علاوه بر شکستن آسپاراژین با جلوگیری از مراحل G0/G1 موجب کاهش سنتز و همانندسازی DNA در سلول های توموری می شود (۸).

به دلیل فعالیت ضد توموری ال-آسپاراژینازها، تلاش شده است تا نیمه عمر این ماده در خون افزایش یابد. برخی از این تلاش ها شامل به دام انداختن آنزیم در لیپوزوم ها یا میکروکپسول ها (از طریق پیوند کووالانسی به ماکرومولکول هایی مانند دکستران، آلبومین یا مونومتوکسی پلی اتیلن گلیکول) بوده است. اما متأسفانه هیچ یک از این روش ها نتوانسته است زیان های درمانی ال-آسپاراژیناز را از بین ببرد (۹ و ۱۰). به همین دلیل امروزه دانشمندان به دنبال شناسایی آنزیم های جدید با عمل کرد بهتر و نیز بررسی آنزیم های مشابه از



شکل ۱: ساختار حامل نوترکیب دارای ژن آسپاراژیناز.

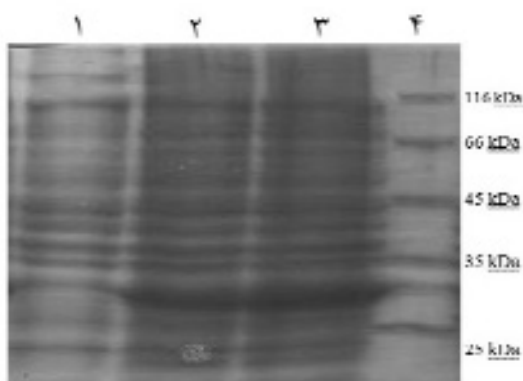
طریق SDS-PAGE بررسی و مقایسه گردید. همچنین برای ارزیابی میزان بیان در زمان های قبل و پس از القا ۲، ۴، ۶ و ۱۶ ساعت، دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت های ۰/۵ مولار و ۱ مولار IPTG و محیط کشت های LB) و (TB) Traffic Broth از روش SDS-PAGE استفاده گردید.

د) انتقال پلاسمید دارای ژن متیونین آمینوپیتیداز به میزبان نوترکیب: در این مرحله میزبان تولید کننده آنزیم متیونین آمینوپیتیداز (MAP) نوترکیب از شرکت سینازن خریداری گردید. قبل از انتقال حامل نوترکیب حاوی ژن *map*، بیان پروتئین نوترکیب در هر دو میزبان از طریق SDS-PAGE مشاهده شد. میزبان تولید کننده متیونین آمینوپیتیداز در محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  کشت داده شد. پس از استخراج پلاسمید حاوی ژن *map*، مراحل ترانسفورماسیون بر روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و کانامایسین به ترتیب با غلظت های  $100 \mu\text{g/ml}$  و  $50 \mu\text{g/ml}$  انجام گرفت. کلنی رشد کرده بر روی محیط آگار دار دوباره کشت داده شد. سپس با استفاده از روش SDS-PAGE بیان هم زمان دو پروتئین مشاهده گردید.

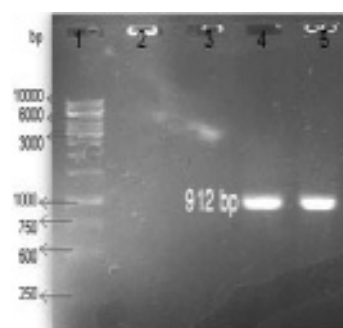
ه) آنالیز پروتئین نوترکیب به روش وسترن بلات: پروتئین ها از روی ژل SDS-PAGE به کمک روش انتقال در تانک به غشای نیتروسولوزی انتقال یافتند. به منظور جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی پروتئین های نشان دار، مناطق آزاد غشا قبل از مرحله تشخیص به وسیله توئین ۲۰ مسدود شدند. در مرحله بعد غشا در ۱۰ میلی لیتر آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰۰) در محلول TBS حل گردید. غشا پس از شستشو با بافر تریس نمکی

مهندسی شده کلون گردید (شکل ۱). سپس محصول الحاق شده به کمک شوک حرارتی به درون باکتری مستعد شده اشریشیا کلی Top10 ترانسفورم شد. پلاسمیدهای حاصل از کلونی های نوترکیب، با استفاده از کیت فرمنتاز استخراج شدند. سپس با استفاده از تکنیک های هضم آنزیمی، PCR و مشاهده بر روی ژل آگاروز، کلون نوترکیب انتخاب گردید. برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید مربوط به کلنی تأیید شده استخراج و با روش توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از توالی یابی با سکانس استاندارد دارویی مقایسه گردید.

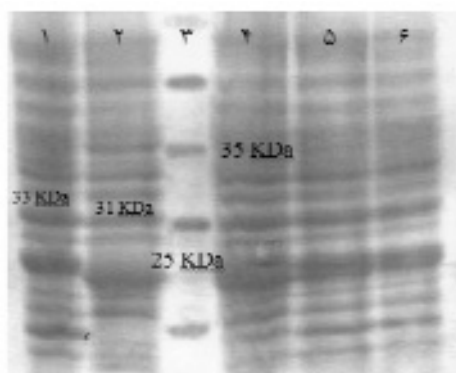
ج) بیان و بهینه سازی پروتئین نوترکیب: پلاسمید نوترکیب به باکتری های مستعد شده اشریشیا کلی Origami DE3 به عنوان میزبان بیانی منتقل شد. سپس برای القای تولید انبوه پروتئین نوترکیب از IPTG (ایزو پروپیل بتا-دی - تایو گالاتو پیرانوزید) استفاده گردید. در مرحله بعد برای آنالیز و مشاهده بیان پروتئین نوترکیب از روش SDS-PAGE لاملی استفاده شد. به منظور افزایش بیان و سنجش پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا، شرایط مؤثر در بیان آن مانند سویه های بیانی، مقدار IPTG، دما، زمان پس از القا و محیط کشت بهینه سازی گردیدند. برای بهینه سازی سویه های بیانی، سلول های BL21 DE3 plyS، Origami DE3، Rossetta DE3 plyS و BL21 Codon plus به طور جداگانه بر روی محیط LB Broth کشت داده شدند. پس از رسیدن به  $OD=0.6$  (چگالی نوری) مراحل مستعد کردن و ترانسفورمیشن انجام گرفتند. سپس میزان بیان در کلنی های نوترکیب هر سویه، از



شکل ۳: تشخیص تولید پروتئین با روش SDS-PAGE. ستون ۱) قبل از القا با IPTG، ستون های ۲ و ۳) چهار ساعت پس از القا با IPTG (ستون ۴) مارکر وزنی پروتئین.

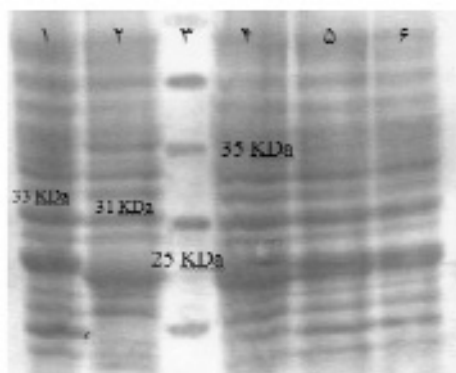


شکل ۲: محصول واکنش PCR. ستون ۱) مارکر 1Kb، ستون های ۲ و ۳) کنترل منفی، ستون های ۴ و ۵) ژن آسپاراژیناز تکثیر شده (912bp).

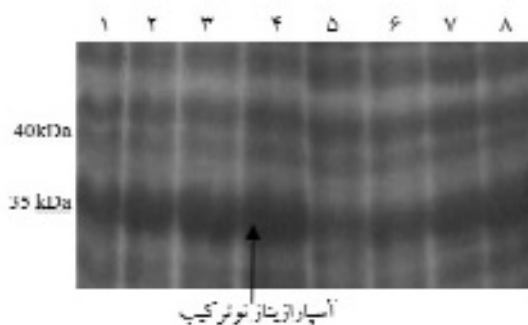


شکل ۵: بهینه سازی مقدار IPTG. ستون ۱) مارکر، ستون ۲) سویه Origami DE3 القا شده با نیم میلی القا شده با ۱ میلی مولار IPTG، ستون ۳) سویه Origami DE3 القا شده با نیم میلی مولار IPTG، ستون ۴) سویه BL21 DE3 plysS القا شده با ۱ میلی مولار IPTG، ستون ۵) باکتری BL21 DE3 plysS القا شده با نیم میلی مولار IPTG.

می شود (شکل ۳). بیشترین میزان بیان پروتئین نوترکیب، به ترتیب در سویه های Origami DE3 و BL21 DE3 plysS مشاهده گردید. بنابراین از سویه های یاد شده برای بهینه سازی بیان در مراحل بعد استفاده شد. همچنین نتایج نشان داد که به منظور تولید بهینه پروتئین نوترکیب بهترین دما، غلظت IPTG، زمان و نوع محیط کشت به ترتیب دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (شکل ۴)، غلظت ۰/۵mM (شکل ۵)، ۴ ساعت القا و محیط ترافیکی برات (شکل ۶) می باشد. به منظور حذف کامل متیونین (فرمیل متیونین) از ابتدای زنجیره پروتئین، پلاسمید میزان تولید کننده آنزیم متیونین آمینوپیتیداز نوترکیب وارد میزان تولید کننده آسپاراژیناز نوترکیب شد. در شکل ۷ بیان دو پروتئین متیونین آمینوپیتیداز (۳۳ کیلو



شکل ۷: الگوی ژل SDS-PAGE. ستون ۱) میزان تولید کننده متیونین آمینوپیتیداز (۳۳kDa)، ستون ۲) میزان تولید کننده آسپاراژیناز (۳۱kDa)، ستون ۳) مارکر وزنی پروتئین، ستون ۴) میزان تولید کننده متیونین آمینوپیتیداز و ال-آسپاراژیناز، ستون ۵) میزان تولید کننده متیونین آمینوپیتیداز و ال-آسپاراژیناز چهار ساعت پس از القا، ستون ۶) میزان تولید کننده متیونین آمینوپیتیداز و ال-آسپاراژیناز شش ساعت پس از القا.

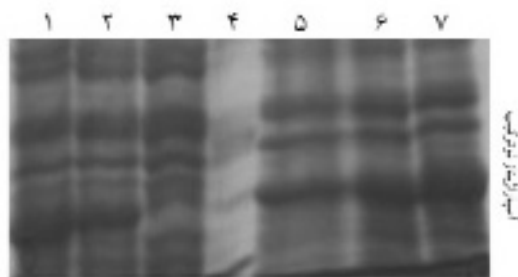


شکل ۴: بهینه سازی دما. ستون ۱) دو ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۲) چهار ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۳) شش ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۴) ۲۴ ساعت پس از القا در دمای ۳۷°C، ستون ۵) دو ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۶) چهار ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۷) شش ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C، ستون ۸) ۲۴ ساعت پس از القا در دمای ۳۰°C.

حاوی توین ۰/۰۵٪، درون آنتی بادی ثانویه کانجوگه شده با آنزیم پراکسیداز قرار داده شد. در نهایت غشا پس از شستشو با بافر تریس در معرض سوبسترای آنزیم پراکسیداز (شامل ۵ میلی گرم در میلی لیتر دی آمینوبنزیدین و پراکسیداز هیدروژن ۱ درصد در بافر تریس نمکی با pH ۵/۷ قرار گرفت.

## نتایج

نتایج PCR تکثیر قطعه ۹۱۲ جفت بازی (ژن آسپاراژیناز) را نشان داد (شکل ۲). نتایج حاصل از روش SDS-PAGE نشان داد که پروتئین نوترکیب به درستی پس از چهار و شش ساعت القا با IPTG در میزان بیانی اشریشیا کلی Origami DE3 تولید



شکل ۶: بهینه سازی محیط کشت و زمان. ستون ۱) شش ساعت پس از القا در محیط LB، ستون ۲) چهار ساعت پس از القا در محیط LB، ستون ۳) قبل از القا در محیط LB، ستون ۴) مارکر، ستون ۵) دو ساعت پس از القا در محیط TB، ستون ۶) چهار ساعت پس از القا در محیط TB، ستون ۷) شش ساعت پس از القا در محیط TB.

آن ها ۴۶ درصد گزارش نمودند (۱۹). بررسی ها نشان داده است که استفاده از DNA نوترکیب به منظور انتقال DNA می تواند میزان تولید و فعالیت آنزیم را بهبود بخشد. کرنا (Corena) و همکاران در سال ۲۰۰۱، نشان دادند که کلنی های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب در مقایسه با سویه های عادی آسپاراژیناز بیشتری را تولید می نمایند (۲۰). خوشو (Khushoo) و همکاران در سال ۲۰۰۴، از توالی رهبر Pel B به منظور تولید آسپاراژیناز نوترکیب پری پلاسمی استفاده نمودند. محققین یاد شده با تکثیر ژن *ansB* کدکننده آسپاراژیناز II در اشریشیا کلی K12 با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، محل برش آنزیم های *BamHI* و *NdeI* را در دو طرف پرایمر وارد نمودند. همچنین کلون سازی ژن مورد نظر در وکتور بیانی *pET14b* حامل قطعه فیوژن HisTag 6x در پایانه آمینی انجام دادند (۱۶). اما برخلاف مطالعه یاد شده ما در این پژوهش از توالی آسپاراژیناز بدون توالی سیگنال پپتید طبیعی ژن و نیز وکتور بیانی *pE-T32* مهندسی شده (فاقد Tag Trx) استفاده نمودیم. در اکثر مطالعات انجام شده از سویه های معمولی و یا نوترکیب به منظور تولید آسپاراژیناز II در فضای پری پلاسمیک استفاده شده است. اما در مطالعه حاضر مراحل کلونینگ و طراحی پرایمر طوری انجام گرفت که پروتئین بدون توالی آمینواسیدی اضافی در سیتوپلاسم بیان گردد. از آن جایی که در این روش بیان پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتری اشریشیا کلی بالا می رود، احتمال حذف نشدن کامل متیونین ابتدایی در پروتئین نوترکیب وجود داشت. به همین دلیل برای حذف کامل متیونین ابتدایی از بیان هم زمان متیونین آمینوپپتیداز نوترکیب استفاده گردید.

### نتیجه گیری

امروزه استفاده از ال-آسپاراژیناز در درمان مولکولی لوکمی، پیشرفت قابل ملاحظه ای داشته است. در حال حاضر این آنزیم از باکتری های اشریشیا کلی و اروینیا کریزانتی جداسازی و به صورت تجاری به عنوان داروی ضدسرطان (لوکمی لنفوبلاستیک حاد و لنفومای غیرهوچکینی) عرضه می گردد. بنابراین نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای ایجاد میزبان با قابلیت بیان



شکل ۸: تست وسترن بلات: ستون ۱) آسپاراژیناز نوترکیب در باکتری BL21 DE3 PlyS، ستون ۲) آسپاراژیناز نوترکیب در باکتری Origami DE3، ستون ۳) مارکر و ستون ۴) آسپاراژیناز استاندارد.

دالتون) و ال-آسپاراژیناز (۳۱ کیلو دالتون) با روش SDS-PAGE نشان داده شده است. در نهایت برای تایید نهایی آسپاراژیناز نوترکیب، تست وسترن بلات به انجام رسید (شکل ۸).

### بحث

فرآیند تولید ال-آسپاراژیناز به وسیله ارگانیسم های مختلفی مانند قارچ ها (پنی سیلیوم، اسپریژیلوس و نکتریا)، باکتری ها (مایکوباکتریوم، اشریشیا کلی، سراشیا مارسسنس و اروینیا کاروتوورا)، مخمرها و سلول های حیوانی صورت می گیرد. اما آنزیم حاصل از همه آن ها فعالیت ضدتوموری ندارد (۸). امروزه مطالعات زیادی بر روی سویه های جدید تولیدکننده این آنزیم در حال انجام است. به عنوان نمونه با استخراج ال-آسپاراژیناز از اکتینومیست های دریایی مشخص گردید که اکتینومیست های دریایی نیز می توانند به عنوان یک عامل ضدسرطان پتانسیل تولید ال-آسپاراژیناز را داشته باشند (۱۲). به طور طبیعی در باکتری اشریشیا کلی دو نوع آسپاراژیناز تولید می شود. هر کدام از این آنزیم ها به وسیله ژن های مختلفی بیان می شوند و خاصیت فیزیکوشیمیایی شان نیز متفاوت است (۱۳ و ۱۴). آسپاراژیناز نوع اول یک پروتئین سیتوپلاسمی است و نوع دوم یک پروتئین پری پلاسمیک با فعالیت ضدتوموری می باشد (۱۵ و ۱۶). pH بهینه برای فعالیت آسپاراژیناز نوع اول ۶/۸ و برای نوع دوم بین ۷/۵ تا ۸/۶ می باشد (۱۷ و ۱۸). مایتا (Maita) و همکاران در سال ۱۹۷۴، توالی آمینواسیدی آسپاراژیناز را در باکتری های اروینیا کریزانتی و اشریشیا کلی مقایسه و میزان تشابه این پروتئین را در

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل بخش تحقیق و توسعه شرکت تحقیقاتی تولیدی سیناژن به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

بالای ال- آسپاراژیناز نوترکیب، می تواند گامی بزرگ در مسیر پیشرفت و افزایش تولید این آنزیم در صنعت محسوب شود. همچنین یافته های ما نشان داد که به منظور ارزیابی اثرات بالینی و نیز به عنوان یک آنزیم ضدلوکمی می توان از آسپاراژیناز به عنوان یک گزینه مناسب در مطالعات بعدی استفاده نمود.

## References

1. Kotzia GA, Labrou NE. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. *J. Biootechnol.* 2007; 127: 657-669.
2. Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. Do bacterial L-asparaginase utilize a catalytic triad Thr-Tyr-Glu?. *J. Biochem. Biophys. Acta.* 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. Afrasiabi R, Aghaiypour K, Kafilzadeh F, Safaviyeh S. Cloning, sequence analysis, and expression of L-asparaginase obtained from *Erwinia chrysanthemi*. *Jouenal of Microbial World.* 2010; 3(1): 7-15.
5. Lubkowski J, Palm G, Gilliland Gary L, Derst CH, Rohm K, wlodawer A. Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase. *J. Biochem.* 1996; 241: 201-207.
6. Harms E, Wehner A, Aung HP? Rohm KH. A catalytic role for threonine-12 of *E.coli* asparaginaseII as established by site-directed mutagenesis. *FEBS.* 1991; 285: 55-58.
7. Ferrara MA, Severino NMB, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EMM, Siani AC, Pereira N, Torres FAG, Bon EPS. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae Asp3* gene. *Enzyme Microb. Tech.* 2006; 39: 1457-1463.
8. 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.
9. Ward KR, Adams GDJ, Alpar HO, Irwin WJ. Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilisation-a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant. *J. Pharmaceutics.* 1999; 187: 153-162.
10. Zhang YQ, Zhou WL, Shen WD, Chen YH, Zha XM, Shirai K, Kiguchi K. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L-asparaginase bioconjugates. *J. Biotechnol.* 2005; 120: 315-326.
11. Rusel D, Sambrook J. *Molecular cloning A laboratory Manual.* Third edition ?Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
12. Nakahama K, Imada A, Igarasi S, Tubaki K. Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species *J Gen Microbiol.* 1973; 75: 269-273.
13. Jennings MP, Beacham IR. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II ansB and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 1491-1498.
14. Jeristrom PG, Liu J, Beacham IR. Regulation of *E. coli* l-asparaginase II and l-aspartaseby the fnr gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 41: 127-130.
15. Roberts J, Bursonand G, Hill JM. New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1968; 95: 2117-2123.
16. Khushoo A, Pal Y, Singh BN, Mukherjee KJ. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. *Protein Expression Purificat.* 2004; 38: 29-36.
17. Avramis VI, Panosyan EH. Pharmacokinetic/pharmacodynamics relationships of asparaginase formulations: The past, the present and recommendations for the future. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44: 367-393.
18. Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2007; 27: 45-62.
19. Maita T, Morokuma K, Mastuda G. Amino acid sequence of L-asparaginase from *E. coli*. *J. Biochem.* 1974; 76: 1351-1354.
20. Corena CP, Lupescu I, Vatafu I, Caraiiani T, Savoivu 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.



## Cloning and Cytoplasmic Expression of L-Asparaginase II in *E. coli*

Hossein Mahboudi<sup>1</sup>, Mansour Abachi<sup>2</sup>, Shahram Araghi<sup>2</sup>, Haleh Hamedifar<sup>3</sup>, Behrouz Vaziri<sup>4</sup>, Fereidoun Mahboudi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

<sup>2</sup>M.Sc., Department of Research and Development, CinnaGen Co., Tehran, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Research and Development, CinnaGen Co., Tehran, Iran

<sup>4</sup>Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Protein Chemistry Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

<sup>5</sup>Associate Professor, Biotechnology Research Center, Recombinant Protein Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

---

### Abstract

**Background and objectives:** L-Asparaginase (isozyme II) is a natural product of *E. coli* that possesses an antitumor activity. This enzyme is used for treating acute lymphoblastic leukemia (ALL). The aim of this study was to clone the corresponding gene without signal peptide and also without first methionine as well as to express the gene in cytoplasm.

**Materials and Methods:** The L-Asparaginase gene was isolated by PCR from *E. coli* K12 strain and cloned into engineered expression vector pET32. Sequencing and evaluation of gene expression were done by routine procedure. Methionine amino peptidase containing recombinant plasmid was purified and transferred into recombinant asparaginase producing bacterium by heat shock method.

**Results:** The majority of L-asparaginase was expressed in cytoplasm. Based on high expression of methionine amino peptidase enzyme in *E. coli* Origami, it was expected that the first methionine of L-asparaginase has been removed efficiently.

**Conclusion:** According to the achieved results, the recombinant bacterium with extensive ability to express cytoplasmic recombinant L-asparaginase is an ideal candidate for industrial production of L-asparaginase.

**Keywords:** L-Asparaginase II, *Escherichia coli*, Cloning, Gene expression

---

**Correspondence to:** Fereidoun Mahboudi

E-mail: mahboudif@cinnagen.com

Tel: +989121374118

Journal of Microbial World 2010 3(2): 87-93