

تولید داروی نو ترکیب آسپاراژیناز باکتری *E. coli* در مقیاس آزمایشگاهیزهرا زینلی^۱، حمید باخرد^{۲*}

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: *L-asparaginase* آنزیم دارویی برگرفته شده از باکتری اشرشیاکلی می‌باشد و یکی از داروهایی است که در درمان سرطان خون حاد لنفوبلاستیک به کار می‌رود. کاهش آسپاراژین خون بعد از استفاده از آنزیم آسپاراژیناز می‌تواند مرگ را برای این سلول‌ها به دنبال داشته باشد. هدف از این طرح، بررسی امکان تولید و تخلیص آنزیم آسپاراژیناز می‌باشد.

روش‌ها: ژن آنزیم آسپاراژیناز موجود در ژنوم باکتری اشرشیاکلی با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. پس از تخلیص، ژن فوق در وکتور pET28a کلون و به میزبان باکتری انتقال داده شد. پس از ترانسفورماسیون، شرایط مختلف بیان پروتئین جهت بهینه‌سازی بررسی گردید. بیان آنزیم نو ترکیب به کمک SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. سپس آنزیم آسپاراژیناز با روش کروماتوگرافی تمایلی و با کمک ستون حاوی رزین Ni-NTA و روش هیپرید خالص شد و در نهایت فعالیت آنزیمی آن بررسی گردید.

یافته‌ها: بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز در باکتری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، غلظت ۱ میلی‌مولار از القاگر و زمان ۲۰ ساعت پس از القاء بود. آنزیم آسپاراژیناز نامحلول با استفاده از ستون نیکل خالص شده و روی ستون فرایند تاخوردگی مجدد (Refolding) انجام شد. با توجه به فعالیت آنزیم ریفرولد شده در تست فعالیت آنزیمی می‌توان نتیجه گرفت فرایند تاخوردگی مجدد آنزیم به درستی انجام شده است.

نتیجه‌گیری: به دلیل اهمیت زیاد تولید آنزیم آسپاراژیناز در ایران و نیاز گروهی از بیماران برای استفاده از این آنزیم، در این پروژه با بهینه کردن فرایند بیان و تخلیص، آنزیم *L-asparaginase* در مقیاس آزمایشگاهی تولید شد.

واژگان کلیدی: لوسمی حاد لنفوئیدی؛ آسپاراژیناز؛ پروتئین نو ترکیب؛ بیوفارماسئوتیکس؛ آنزیم

ارجاع: زینلی زهرا، باخرد حمید. تولید داروی نو ترکیب آسپاراژیناز باکتری *E. coli* در مقیاس آزمایشگاهی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛

۴۰ (۶۹۶): ۹۵۰-۹۵۶

داروی برگرفته شده از *E. coli* آنزیم *L-asparaginase* نام دارد و یکی از داروهایی اصلی در درمان سرطان خون حاد لنفوبلاستیک می‌باشد. آسپاراژینازها، آنزیم‌هایی هستند که تبدیل آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کنند (۵). علاقه به آسپاراژینازها از خاصیت ضد توموری آنها ناشی می‌شود. به خصوص نوع ۲، که اختصاصی تر بوده و فعالیت ضد توموری بیشتری را نشان داده است (۶-۸). آسپاراژین یک اسید آمینه‌ی غیر ضروری است که در سنتز DNA، RNA و پروتئین نقش دارد و رشد سلول را القاء می‌کند. در حالی که سلول‌های سالم و طبیعی آسپاراژین را از طریق رژیم غذایی یا سنتز آسپاراژین از آسپاراتات به وسیله‌ی فعالیت

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) ALL، نوعی سرطان است که بر روی لنفوسیت‌ها و سلول‌های پیش‌ساز و تولیدکننده‌ی لنفوسیت در مغز استخوان تأثیر می‌گذارد (۱). در این بیماری سلول‌های سرطانی توانایی خود را برای بالغ شدن از دست می‌دهند و گلبول‌های سفید سالمی که سلول‌های لنفوسیتی را تولید می‌کنند، جای خود را به گلبول‌های سفیدی می‌دهند که نمی‌توانند به شکل درستی بالغ شوند. این سلول‌ها، سلول‌های طبیعی خون را تحت تأثیر قرار داده و در نهایت باعث کاهش تولید گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و پلاکت‌های خون می‌شوند (۲-۴).

۱- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حمید باخرد؛ استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: bakheradh@pharm.mui.ac.ir

بعد از تخلیص مجدد برای حذف آنزیم و بافر، با کمک آنزیم T4 DNA لیگاز (Thermo Fisher) (T4 DNA Ligase) در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت ژن آسپاراژیناز در وکتور pET28a کلون شد. محصول الحاق، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد سویه باکتری *E. coli* BL21 (DE3) و *E. coli* T7 shaffle ترانسفرم گردید. کلونی‌های نوترکیب با غربالگری آنتی‌بیوتیکی کانامایسین با غلظت ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جدا شدند و حضور پلاسمید حاوی ژن آسپاراژیناز به کمک تکنیک PCR مورد تأیید قرار گرفت.

بیان آنزیم آسپاراژیناز در دو سویه *E. coli* BL21 (DE3) و *E. coli* T7 shaffle جهت بررسی میزان بیان پروتئین آسپاراژیناز در دماها، زمان‌ها و غلظت‌های مختلف القاگر، از کلون جداسازی شده کشت شبانه تهیه شد و برای بررسی شرایط مختلف بیان، به چند فاکون حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB (Himedia) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و پس از این که جذب سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ تا ۰/۶ رسید برای بررسی بهترین دما و زمان پس از القاء سه دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه انتخاب شد و در زمان‌های مختلف پس از القاء از آن‌ها نمونه‌گیری انجام گردید. برای بررسی میزان مناسب القاگر غلظت‌های مختلف، القاگر، مورد آزمایش قرار گرفت (غلظت ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی مولار از ماده‌ی القاکننده (Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside) IPTG (Sinagene)) و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۷۵ در دقیقه انکوبه شد. در نهایت بیان پروتئین نوترکیب توسط ژل الکتروفورز سدیم دودوسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بررسی شد.

تخلیص آنزیم آسپاراژیناز و تأیید آن به کمک روش وسترن بلات: رسوب سلولی حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر کشت باکتری به کمک بافر لیزکننده احیا گردید و توسط دستگاه سونیکاسیون سونیکیت شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه داخل سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ سوپرناتانت شفاف جمع‌آوری شد و جهت خالص‌سازی پروتئین از ستون نیکل (Ni-NTA) و به منظور بازیابی عملکرد پروتئین، از روش هیبرید استفاده گردید. ستون ابتدا با بافر متصل‌کننده و سپس بافر شستشو شسته شد و در نهایت با یک گرادیان غلظت افزایشی از ایمیدازول ۲۰، ۴۰، ۶۰ و غلظت کاهشی اوهره از ۸ مولار تا محلول بدون اوهره (به منظور تاخوردگی مجدد پروتئین روی ستون) شسته شد. در نهایت برای خارج کردن پروتئین با تاخوردگی صحیح، ستون با ۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول شسته شد. میزان خلوص پروتئین به دست آمده توسط روش SDS-PAGE ارزیابی گردید. در گام بعدی جهت

آسپاراژین سنتاز به دست می‌آورند، سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد فاقد آنزیم آسپاراژین سنتاز هستند و نمی‌توانند آسپاراژین سنتز کنند بنابراین به آسپاراژین حاصل از رژیم غذایی نیازمند هستند.

L-asparaginase با تبدیل L-آسپاراژین به L-آسپارتیک اسید و آمونیاک، باعث کاهش سطح پلاسمایی آسپاراژین در سلول‌های لوسمیک می‌شود، که این امر به نوبه خود منجر به کاهش سنتز DNA، RNA، پروتئین و مهار رشد سلول می‌گردد. در نهایت با فعال شدن مکانیسم‌های مرگ سلولی و آپوپتوز سلول‌های لوسمیک دچار مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌شوند (۹). هدف از این مطالعه، کلون کردن ژن آسپاراژیناز *E. coli* بیان کردن، بهینه کردن کشت و خالص‌سازی آن در شرایط مختلف بود به نحوی که آنزیم *L-asparaginase* در مقیاس آزمایشگاهی تولید شده و فعال بودن آن مورد سنجش گیرد.

روش‌ها

تخلیص ژنوم باکتری: رسوب سلول باکتری اشرشیاکلی در یک میلی‌لیتر بافر PBS حل شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به یک ویال جداگانه منتقل گردید. مقدار ۴۵۰ میکرولیتر از بافر شماره یک (EDTA 2M, NaOH 25Mm, Ethanol 96%) به ویال اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ انجام و محلول رویی دور ریخته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شماره دو (Tris 0.5M, EDTA 2M, Tween 20, Triton X100) به رسوب اضافه و رسوب حاوی ژنوم باکتری به آرامی در محلول حل شد.

تکثیر ژن آنزیم آسپاراژیناز و کلون آن در وکتور بیانی *pET28a* در این مرحله با استفاده از ژنوم باکتری *E. coli*، کمک آنزیم Pfu Master Mix (DNA Biotech)، پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر (Biomatik Canada) و تحت شرایط زمانی و دمایی مشخص ژن آسپاراژیناز تکثیر شد.

تسوالی آغـازگر پیشـرو:

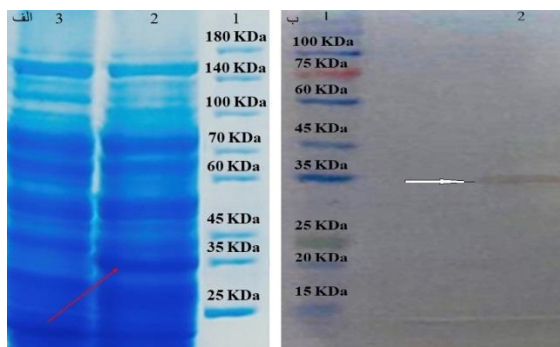
CCGGAATTCATGGAGTTTTTCAAAAAGA-3

تسوالی آغـازگر معکـوس:

CCGCTCGAGTTAGTACTGATTGAAGAT-3

آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که در دو سمت ژن آسپاراژیناز دو جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودکننده *EcoRI* و *XhoI* (Restriction enzymes) وجود آمد. پس از تخلیص محصول PCR از ژل آگارز، وکتور pET28a و ژن آسپاراژیناز توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* (Thermo Fisher) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت برش داده شدند و

بررسی بیان آنزیم اسپاراژیناز در شرایط مختلف و تأیید آن: برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، باکتری حاوی ژن اسپاراژیناز نوترکیب در محیط مناسب و در شرایط مختلف کشت داده شد و نمونه‌ها قبل و بعد از القاء توسط IPTG، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القاء توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه‌ی تقریبی ۳۶ کیلودالتون در دمای ۳۷ درجه، زمان ۲۰ ساعت و میزان القاگر ۱ میلی مولار بیشترین بیان را داراست (شکل ۲-الف). بعد از بیان آنزیم اسپاراژیناز در دماهای ۳۷، ۲۵ و ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف پس از القاء و مقایسه‌ی نمونه‌های حاصل از رسوب سلول و مایع رویی به کمک SDS-PAGE، مشاهده شد که بیشترین میزان پروتئین بیان شده به شکل نامحلول و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد. کاهش دما منجر به کاهش بیان آنزیم اسپاراژیناز شد در حالی که میزان پروتئین بیان شده به شکل محلول تغییر چندانی نشان نداد (نتایج نشان داده نشده است).



شکل ۲. الف. ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE حاصل بیان ۲۰ ساعت پس از القاء آنزیم اسپاراژیناز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد. به ترتیب از سمت راست به چپ: ۱. مارکر پروتئینی (Jena Bioscience)، ۲. بیان آنزیم اسپاراژیناز ۲۰ ساعت پس از القا (باند پروتئین با فلش نشان داده شده است)، ۳. کنترل القا نشده. ب. نتایج حاصل از وسترن بلات. به ترتیب از چپ به راست، مارکر پروتئینی، نمونه بیان و نمونه تخلیص آنزیم اسپاراژیناز را نشان می‌دهد.

به منظور تأیید باند حاصل از تولید آنزیم در تکنیک وسترن بلات، از آنتی‌بادی ضد هیستیدین استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲-ب دیده می‌شود، در محدوده‌ی ۳۶ کیلو دالتون تک بانندی ظاهر شده است که بیان و تولید آنزیم اسپاراژیناز در مطالعه‌ی حاضر را تأیید می‌کند.

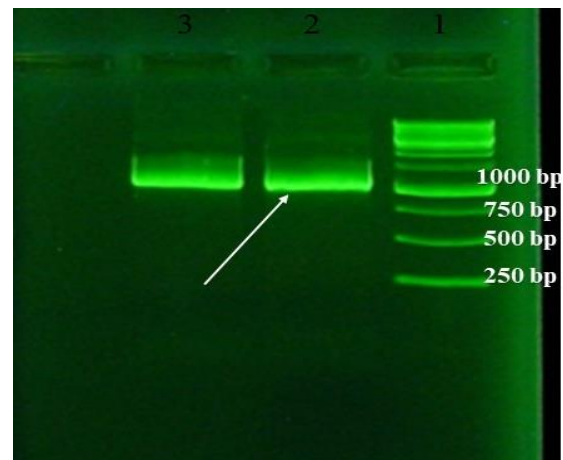
تخلیص پروتئین و تاخوردگی مجدد آن: به دلیل به دست آوردن بیشترین میزان آنزیم، در این مطالعه از پروتئین بیان شده به شکل نامحلول در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و روش هیبرید برای

تأیید بیان پروتئین نوترکیب از تکنیک وسترن بلات و آنتی‌بادی اختصاصی ضد برچسب (Tag) هیستیدین استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم اسپاراژیناز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم اسپاراژیناز تخلیص شده، واکنش‌های L-اسپاراژین، آنزیم اسپاراژیناز و بافر تریس با در نظر گرفتن حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر و با چهار غلظت ۳، ۷، ۱۱، ۱۴ میکروگرم آنزیم به ازای هر واکنش و مقدار ثابت سوپسترا (۱۰۰ میلی مولار ال-اسپاراژین) انجام شد. به عنوان واکنش کنترل به جای آنزیم از بافر تریس استفاده شد و واکنش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند (هر واکنش با سه بار تکرار انجام گردید). سپس به تمامی میکروتیوپ‌ها ۶ میکرولیتر فنول رد (۲/۵۷/w درصد) اضافه و بعد از چند دقیقه جذب تمام واکنش‌ها در ۵۶۰ نانومتر با کمک دستگاه Elisa Reader خوانده شد. نتایج از روی نمودار حاصل از مقدار جذب نمونه‌ها بررسی گردید.

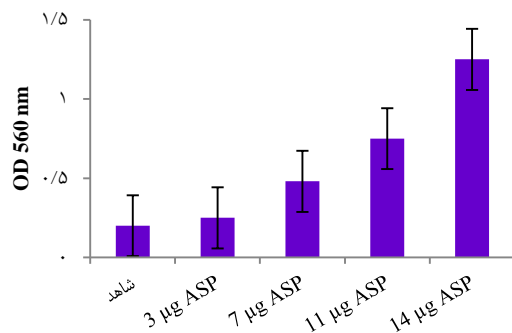
یافته‌ها

انتقال ژن کدکننده‌ی اسپاراژیناز به وکتور pET28a جهت انتقال ژن کدکننده‌ی آنزیم اسپاراژیناز به وکتور pET28: ابتدا با استفاده از تکنیک PCR این ژن تکثیر شد. ظهور باند در حدود ۱۰۶۰ bp نشان‌دهنده‌ی تکثیر موفقیت‌آمیز ژن اسپاراژیناز می‌باشد (شکل ۱). ژن تکثیر یافته‌ی آنزیم اسپاراژیناز پس از برش توسط آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و XhoI درون وکتور pET28a برش داده شده با همان آنزیم‌ها، کلون شد و به میزان باکتری ترانسفورم گردید. روی چند کلونی از کلونی‌هایی به دست آمده تخلیص پلاسمید انجام شده و با تکنیک‌های PCR و هضم آنزیمی وجود ژن اسپاراژیناز در آنها تأیید شد.



شکل ۱. تکثیر ژن کدکننده‌ی آنزیم اسپاراژیناز. ۱. لدر DNA - ۲ و ۳ محصول PCR. محل باند اسپاراژیناز با فلش نشان داده شده است.

سازمان بهداشت جهانی قرار دارد (۲-۵). میزان آنزیم اسپاراژیناز تولید شده به شکل قابل توجهی به شرایط تولید آنزیم بستگی دارد. بنابراین، برای افزایش بازدهی اقتصادی تولید آنزیم، بهینه‌سازی محیط و شرایط کشت برای رشد باکتری‌ها و بیان آنزیم بسیار مهم است (۱۰). طی مطالعات انجام شده قبلی، چندین میکروارگانیسم تولیدکننده‌ی آنزیم اسپاراژیناز مانند *Escherichia coli*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Dickeya chrysanthemi* معرفی شده است و کار غربالگری برای یافتن میکروارگانیسم‌های جدید هنوز ادامه دارد (۱۰).

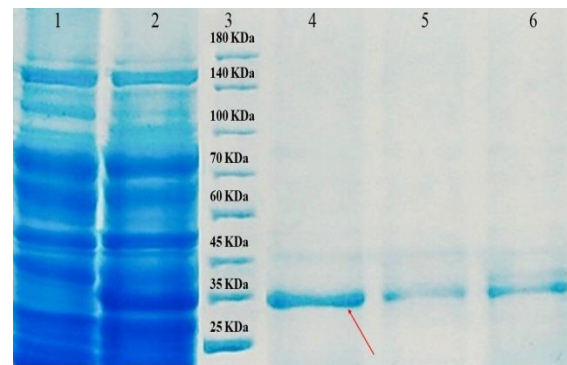


شکل ۴. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم. کنترل محلول بدون اضافه کردن آنزیم. اعداد زیر جدول غلظت‌های مختلف آنزیم مورد استفاده است.

با این وجود تنها آنزیم‌های اسپاراژیناز *E. coli* و *D. chrysanthemi* در مقیاس صنعتی برای مصارف دارویی تولید می‌شوند (۱۱). با توجه به مطالعات گذشته در این پژوهش از سلول‌های میزبان *E. coli* BL21 (DE3) و *E. coli* T7 shaffle و وکتور pET28a استفاده گردید. میزان بیان آنزیم اسپاراژیناز همان‌گونه که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده بود (۱۲) در هر دو سوش از باکتری *E. coli* کم می‌باشد، اما مقدار آنزیم بیان شده در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) به مراتب بیشتر از *E. coli* T7 shaffle بود.

دما، یکی از مهم‌ترین پارامترها در فرایندهای زیستی می‌باشد و دمای مطلوب برای تولید L-asparaginase توسط اکثر میکروارگانیسم‌ها از ۲۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد متغیر است، اما بیشترین میزان بیان در ۳۷ درجه گزارش شده است (۱۳، ۱۴). در این مطالعه، ما میزان بیان آنزیم اسپاراژیناز را در سه دمای ۱۵، ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی کردیم و بیشترین میزان بیان در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده شد. در سلول‌های میزبان مورد استفاده در این پژوهش بهترین میزان بیان آنزیم اسپاراژیناز حدود ۲۰ ساعت پس از القاء حاصل شد. در مطالعات دیگر در سایر سلول‌های میزبان

تخلیص پروتئین استفاده شد و برای تاخوردگی مجدد پروتئین از شستشوی ستون با شیب غلظت اوره استفاده شد. میزان خلوص پروتئین مورد نظر توسط SDS-PAGE ارزیابی گردید (شکل ۳). چنان که در الگوی الکتروفورز مشاهده می‌شود، پروتئین مورد نظر با درجه خلوص مناسبی خالص شده است. میزان بازدهی تولید آنزیم اسپاراژیناز در این مطالعه پس از خالص‌سازی حدود ۱۰ mg/l بود.



شکل ۳. ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد حاصل از تخلیص آنزیم

اسپاراژیناز به کمک ستون حاوی رزین NTA-Ni و روش هیبرید. ۱. کنترل بدون القاگر، ۲. محصول لیز سلولی رسوب یک میلی‌لیتر کشت ۲۰ ساعت پس از القا، ۳. مارکر پروتئینی (Jena Bioscience)، ۴.۵ و ۶ به ترتیب نمونه‌های خارج شده از ستون بعد از شستشو با امیدازول ۵۰۰ میلی‌مولار (پروتئین خالص شده با فلش مشخص شده است).

سنجش فعالیت آنزیم اسپاراژیناز: از آنجایی که آنزیم اسپاراژیناز با تجزیه‌ی اسپاراژین به اسپارتیک اسید و آمونیاک باعث قلیایی شدن و افزایش pH محیط می‌شود، با اضافه کردن معرف فنول رد در میکروتیوپ‌های حاوی محلول واکنش و خوانش تغییر رنگ آن در طول موج مناسب فعالیت آنزیم مطالعه شد. همان‌گونه که شکل ۴ نیز مشخص است، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در واکنش چهارم مشاهده می‌شود که از مقدار ۱۴ میکروگرم آنزیم اسپاراژیناز در این واکنش استفاده شده است. این غلظت آنزیم اشباع‌کننده بود و اضافه کردن مقدار بیشتر آنزیم تفاوتی در نتایج ایجاد نکرد. نتایج نشان می‌دهد این آنزیم فعال بوده و فعالیت آن وابسته به غلظت می‌باشد.

بحث

تجویز اسپاراژیناز، بخش مهمی از درمان سرطان خون لنفوبلاستیک حاد در کودکان و نوجوانان است و به طور معمول در ترکیب با سایر عوامل شیمی‌درمانی در طول درمان این بیماری استفاده می‌شود و در بهبود نتایج بیماران در ۴۰ سال گذشته نقش مهمی داشته است. با توجه به اهمیت آن، این آنزیم سال‌ها در فهرست داروهای ضروری

در وکتور pET28a کلون شد و به باکتری *E. coli* BL21 (DE3) منتقل گردید. بهترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز در باکتری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، غلظت ۱ میلی مولار از القاهر و زمان ۲۰ ساعت پس از القاء بود. آنزیم آسپاراژیناز نامحلول به کمک ستون حاوی رزین Ni-NTA و روش هیبرید به منظور ریفرولد آنزیم خالص‌سازی شد. در مرحله‌ی بعد و طرح‌های آتی می‌توان دو مورد را مورد آزمون قرار داد. مورد اول: با توجه به اینکه در این پروژه از توالی (Sequence) طبیعی خود سلول استفاده شده است می‌توان توالی را با نرم‌افزارهای پیشرفته‌ی بیوانفورماتیکی بهینه‌سازی کرد و اثر این بهینه‌سازی سکانس را در افزایش تولید مورد بررسی قرار داد. مورد دوم: در این پروژه از کشت Batch استفاده شده است که می‌توان برای افزایش بازدهی تولید، کشت Fed-Batch را برای آن بکار برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح شماره‌ی ۳۴۰۰۹۵ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان استخراج شده است. از کلیه‌ی دوستان و همکاران محترمی که در انجام گرفتن این پروژه ما را یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

بهترین میزان بیان ۲۴-۷۲ ساعت پس از القاء، بسته به نوع میزبان گزارش شده است (۱۷-۱۵). بازده تولید در این تحقیق نسبت به سایر گزارش‌ها وضعیت بهتری داشت، به عنوان نمونه میزان بیان آنزیم آسپاراژیناز در *Serratia marcescens* NCIM 2919، ۷ روز پس از القاء ۹/۷۹ mg/l گزارش شد (۱۷) در حالی که در این مطالعه، ۲۰ ساعت پس از القاء، بازده تولید آنزیم در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) به میزان ۱۰ mg/l در کشت Batch محاسبه گردید.

مزیت این مطالعه نسبت به تحقیقات دیگر، استفاده از روش خالص‌سازی نامحلول بود که با این روش، بازده خالص‌سازی بالا رفته و تقریباً تمام پروتئین‌های تولید شده قابل خالص‌سازی است. در مرحله‌ی بعد برای به دست آمدن آنزیم فعال، عمل تاخوردگی مجدد روی ستون کروماتوگرافی با شیب اوره انجام شد که نتیجه‌ی آن صرفه‌جویی در وقت، هزینه و کم کردن مراحل خالص‌سازی می‌باشد. نتایج حاصل از ژل SDS-PAGE بیانگر درصد خلوص قابل قبول این آنزیم توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، ژن آنزیم آسپاراژیناز با موفقیت

References

- Brown PA, Shah B, Fathi A, Wieduwilt M, Advani A, Aoun P, et al. NCCN guidelines insights: acute lymphoblastic leukemia, version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15(9): 1091-102.
- De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J* 2016; 6(7): e441.
- Mehta P. Adult acute lymphocytic leukemia: biology and treatment. *JAMA* 1978; 305(22): 2353-8.
- Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2019; 60(11): 2606-21.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350(15): 1535-48.
- Radadiya A, Zhu W, Coricello A, Alcaro S, Richards NGJ. Improving the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Biochemistry*. 2020; 59(35): 3193-200.
- Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2008; 55(1): 1-20.
- Ebrahimezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol* 2011; 51(3): 307-11.
- Radha R, Arumugam N, Gummadi SN. Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: heterologous expression, purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol* 2018; 111: 129-38.
- Cachumba JJM, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Dos Santos JC, Da Silva SS. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Braz J Microbiol* 2016; 47(Suppl 1): 77-85.
- Vala AK, Sachaniya B, Dudhagara D, Panseriya HZ, Gosai H, Rawal R, et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. *Int J Biol Macromol* 2018; 108: 41-6.
- Nunes JC, Cristóvão RO, Freire MG, Santos-Ebinuma VC, Faria JL, Silva CG, Tavares AP. Recent strategies and applications for L-asparaginase confinement. *Molecules* 2020; 25(24): 5827.
- Chand S, Mahajan RV, Prasad JP, Sahoo DK, Mihooliya KN, Dhar MS, et al. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2020; 67(4): 619-47.
- Alrumman SA, Mostafa YS, Al-Izran KA, Alfaifi MY, Taha TH, Elbehairi SE. Production and anticancer activity of an L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Sci Rep* 2019; 9(1): 3756.
- Mikucki J, Sobiś M, Rózalska M. Localisation of staphylococcal L-asparaginase. *FEMS microbiology letters* 1986; 37(2): 129-33.
- Abdel-Fattah YR, Olama ZA. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state

- culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry* 2002; 38(1): 115-22.
17. El-Bessoumy AA, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(4): 387-93.
18. Sandhya P, Nikku MY, Chaduvula AIR, Dasari VRRK, Donthireddy SR. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of L-Asparaginase by *serratia marcescens*. *J Microbial Biochem Technol* 2010; 2(4).

Production of Recombinant *E.coli* Asparaginase on a Laboratory Scale

Zahra Zeinali¹, Hamid Bakherad²

Original Article

Abstract

Background: *L-asparaginase* is an enzyme derived from *E. coli* and is one of the drugs used to treat acute lymphoblastic leukemia. Decreased blood asparagine after the use of the asparaginase can lead to death for these cells. The aim of this project is to investigate the possibility of the production and purification of the asparaginase enzyme.

Methods: The asparaginase gene of *E. coli* was amplified using PCR technique. After purification, the gene was cloned into pET28a vector and transformed into a bacterial host. After transformation, different protein expression conditions were investigated for optimization. Recombinant enzyme expression was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. The asparaginase enzyme was then purified by affinity chromatography using a column containing Ni-NTA resin and a hybrid method and finally, its enzymatic activity was investigated.

Findings: The high production of asparaginase enzyme in *E. coli* was at 37 °C, 1 mM concentration of IPTG, and incubation 20 hours after induction. Insoluble asparaginase enzyme was purified using a Ni-NTA column and the refolding process was performed on the column. According to the activity of the refolded enzyme in the enzyme activity test, it can be concluded that the refolding process of the enzyme has been done correctly.

Conclusion: Due to the great importance of asparaginase production in Iran and the need of a group of patients to use this enzyme, in this project, by optimizing the expression and purification process, the L-asparaginase enzyme was produced on a laboratory scale.

Keywords: Acute lymphoid leukemia; Asparaginase; Biopharmaceutics; Enzymes; Recombinant proteins

Citation: Zeinali Z, Bakherad H. Production of Recombinant *E.coli* Asparaginase on a Laboratory Scale. J Isfahan Med Sch 2023; 40(696): 950-6.

1- Pharmacy Student, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hamid Bakherad, Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: bakheradh@pharm.mui.ac.ir