

بیان نو ترکیب و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی ال-گلوتامیناز از سویه

بومی *Alteribacillus bidgolensis*صبا معافی^۱، سید عبدالحمید انگجی^{۲*}، حسین غفوری^۳، سجاد صاری خان^{۴*}^۱-کارشناسی ارشد- گروه زیست سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران^۱-دانشیار- گروه زیست سلولی-مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران^۳-دانشیار- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران^۴-مربی پژوهشی- بانک DNA و داده‌های ژنومی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

*صندوق پستی: ۱۵۸۵۵-۱۶۱، تهران، ایران

sarikh@acecr.ac.ir، angaji@khu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

چکیده

ال-گلوتامیناز یکی از اعضای خانواده آمیدوهیدرولاز هاست که به ابر خانواده بتا-لاکتاماز های وابسته به سرین و پروتئین‌های متصل به پنی‌سیلین تعلق دارد. در دهه اخیر ال-گلوتامیناز به خاطر توانایی کاتالیتیکی خود مورد توجه قرار گرفته است و در میان صنایع مختلف به ویژه پزشکی و درمانی ارزش بالایی یافته است. مطالعات در مورد ال-گلوتامیناز در طول چهار دهه پیشرفت‌هایی داشته است، اما در مقایسه با سایر آنزیم‌های مهم صنعتی این پیشرفت سرعت کمی داشته است. هزینه نسبتاً بالای تولید ال-گلوتامیناز یکی از موانع بزرگی است که کاربرد های صنعتی آن را به تاخیر می‌اندازد. از سویی منابع کافی برای تولید انبوه آنزیم برای بررسی آزمایشات کلینیکی گسترده موجود نمی‌باشد. هدف از این مطالعه بیان نو ترکیب ال-گلوتامیناز به صورت محلول از سویه *Alteribacillus bidgolensis*(P4B^T) در سیستم بیانی *Escherichia coli* BL21(DE3) و همچنین بررسی فعالیت آنزیم می‌باشد. در این پژوهش، ژن ال-گلوتامیناز با استفاده از وکتور بیانی pET30a با موفقیت در سیستم بیانی *E. coli* BL21(DE3) کلون شد. بیان محلول در شرایط کشت دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با کمک وکتور تجاری pG-KJE8 که حاوی

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت د ستر سی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، باز نشر و بازآفرینی

کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

مجموعه‌ای از چاپرون‌های مولکولی است، انجام شد. در نهایت، سنجش فعالیت ویژه آنزیم خالص و دیالیز شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ انجام شد و فعالیت آنزیمی برای غلظت ۸ میلی مولار سوبسترا 0.01 ± 0.03 U/mg به‌دست آمد. K_m ال-گلوتامیناز 3.10 mM و V_{max} آن 0.62 U/mg محاسبه شد.

کلید واژگان: کلونینگ، بیان نوترکیب، *Alteribacillus bidgolesis*، ال-گلوتامیناز، چاپرون

۱-مقدمه

ال-گلوتامیناز (L-glutaminase) یا گلوتامین آمیدوهیدرولاز (E.C : 3.5.1.2) یکی از اعضای خانواده بزرگی به نام آمیدوهیدرولازها است که به ابر خانواده‌ی بتا-لاکتامازهای وابسته به سرین و پروتئین‌های متصل به پنی‌سیلین تعلق دارد. این آنزیم به‌طور گسترده‌ای در گیاهان، بافت‌های حیوانی و میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و اکتینومیسیت‌ها موجود می‌باشد [۱]. از لحاظ زیستی، گلوتامینازها نقش مهمی در بیوسنتز متابولیت‌های نیتروژنی متنوع و نگهداری تعادل گلوتامین/گلوتامات در ارگانیسم‌ها دارند. ال-گلوتامیناز فرایند دامیناسیون اسید آمینه ال-گلوتامین را به گلوتامیک اسید و آمونیاک از طریق شکستن پیوند زنجیره جانبی γ -آمید کاتالیز می‌کند [۲]. یک واکنش دو مرحله‌ای ساده برای عملکرد آن وجود دارد، به این صورت که در مرحله‌ی اول رزیدو نوکلئوفیل آنزیم با یک باز قوی فعال می‌شود و به اتم کربن گروه عاملی آمید در ال-گلوتامین حمله می‌کند و ساختار واسطه‌ی بتا-آسیل آنزیم را تشکیل می‌دهد. در مرحله‌ی دوم با فعال شدن نوکلئوفیل توسط مولکول‌های آب، حمله نوکلئوفیلی بر روی کربن استر انجام می‌شود [۳]. ال-گلوتامیناز به‌دلیل توانایی کاتالیزی خود مورد توجه می‌باشد و در میان صنایع مختلف به‌ویژه پزشکی و درمانی ارزش بالایی یافته است [۴]. در دهه گذشته ال-گلوتامیناز توجه بسیاری به خود جذب کرده است و علت

آن استفاده از این آنزیم در درمان سرطان و بیماری‌ها، شامل لوکمی لنفاتیک حاد و HIV با خالی کردن محیط سلول‌های بدخیم از ال-گلوتامین می‌باشد. در حالی‌که، سلول‌های سرطانی به‌علت متابولیسم بالایی که دارند و عدم توانایی آنها در تولید ال-گلوتامین نیاز بیشتری به این آمینواسید دارند، در نتیجه موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود [۵ و ۶]. در بیوتکنولوژی غذایی ال-گلوتامیناز با افزایش گلوتامیک اسید در غذاهای تخمیر شده مانند سویا، به‌عنوان محرک طعم استفاده می‌شود [۷]. علاوه بر این، ال-گلوتامیناز می‌تواند به‌عنوان بیوسنسور و کاندید آنالیزی با تعیین کمیت غلظت ال-گلوتامین در محیط کشت و با تعیین میزان واکنش در سنتز ترئونین استفاده شود [۲]. در این میان، ال-گلوتامینازهای میکروبی برای بسیاری از کاربردهای بیوتکنولوژی شامل موارد دارویی و تولید غذا مورد توجه قرار گرفتند، زیرا جانداران میکروبی تولید آنزیم را با فرایندی سریع، آسان، کم هزینه و سازگار با مراحل پس از جداسازی و خالص‌سازی انجام می‌دهند [۸]. همچنین، ال-گلوتامیناز میکروبی پایداری بیشتری نسبت به انواع استخراج شده از ارگانیسم‌های پیچیده‌تر دارند، در نتیجه در میان کاربردهای مختلف صنعتی جایگزین‌های مناسب‌تری برای تولید آنزیم نسبت به ارگانیسم‌های پیچیده‌تر هستند [۹].

هزینه تولید ال-گلوتامینازها از سویه‌های وحشی بسیار بالا می‌باشد و محصولات آنها عموماً کم و ناکافی هستند که

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ باکتری، پلازمید، محیط، آنزیم‌ها و مواد

در پژوهش تجربی حاضر، باکتری بومی *A. bidgolensis* که پیش‌تر از دریاچه فوق شور آران-بیدگل استخراج شده و در ایران ثبت شده است و هم‌اکنون در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران نگه‌داری می‌شود [۱۶]، تهیه و DNA ژنومی آن با استفاده از کیت GeneJET (ThermoFisher, cat.No:K0721) تخلیص شد. وکتورهای مورد مطالعه در این پژوهش، وکتور، pET30a از شرکت Novogene و میزبان باکتریایی، باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) می‌باشد. همچنین، در این پژوهش محیط کشت LB broth و LB agar (Merck) برای تکثیر و بیان ژن نوترکیب استفاده شد. ترکیبات کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کلروآمفنیکل (۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-آرآینوز (Merck) و ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر تتراسایکلین (Merck) در محیط کشت استفاده شد. برای انجام PCR از آنزیم Taq DNA Polymerase ساخت مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (cat.No: MBE0100) استفاده شد و کیت‌های استخراج پلازمید (GeneJET, cat.No:K0502) و خالص‌سازی محصول PCR (GeneJET, cat.No:K0701) و آنزیم‌های برشی *Xho* I، *Eco*R I از شرکت Thermofisher و آنزیم DNase I و لیزوزیم از شرکت (BioBasic) تهیه شدند. لدر DNA از شرکت ThermoFisher (cat.No: SM0311) و لدر پروتئین از شرکت Maxcell (cat.No: LM0211) تهیه شدند.

۲-۲ پیش‌بینی بیان بهینه ژن ال-گلوتامیناز در *E. coli*

برای بررسی تطابق توالی ژن ال-گلوتامیناز برای بیان بهینه در میزبان *E. coli*، توالی این پروتئین با استفاده از ابزار آنالین GenSmart Optimization در سایت GenScript بررسی شد. همچنین، از نظر وجود کدون‌های نادر، این

نمی‌تواند پاسخگوی درخواست‌های صنعتی باشد [۱۰]. در نتیجه، روش‌های مولکولی بکار گرفته شده‌اند تا این مشکل را برطرف کنند. کاربردهای صنعتی نیازمند آنزیم‌هایی با هزینه‌های مقرون به صرفه هستند، بنابراین ارزیابی برای افزایش سطح بیان و ترشح کارآمد به درون محیط کشت اهمیت زیادی برای پذیرفتن آنزیم‌ها خواهد داشت [۱۱]. بیان هترولوگوس ژن‌ها ابزار قدرتمندی است که برای تولید آنزیم‌ها در سطح مورد نیاز استفاده می‌شود [۱۲]. ژن‌های کدکننده‌ی انواع متنوعی از ال-گلوتامینازها در میزبان‌های مختلف کلون شدند و پروتئین‌های نوترکیب حاصل از آنها دارای ویژگی‌هایی مشابه و حتی ارتقا یافته نسبت به انواع وحشی آنزیم‌ها بوده است [۱۵-۱۳].

از سوی دیگر، علیرغم گوناگونی قابل توجه اکثر آنزیم‌ها که به نوعی متأثر از تنوع بالای میکروارگانیسم‌هایی است که از آنها منشأ گرفته‌اند، با این حال به دلیل افزوده شدن سالانه تعداد زیادی سویه جدید به لیست جهانی میکروارگانیسم‌ها یک کنجکاوی همیشگی برای بررسی آنزیم‌های شناسایی شده در آن سویه‌ها برای دستیابی به آنزیم‌های با ویژگی‌های احتمالی برتر و متمایز نسبت به انواع قبلی وجود دارد. ذکر این نکته ضروری است که با وجود پیشرفت‌های کنونی در علم مهندسی پروتئین که طراحی و تولید آنزیم‌های با ویژگی‌های متفاوت را مقدور می‌سازد، با این حال به دلیل محدودیت‌های هزینه‌ای و زمانی الگوگیری از آنزیم‌های موجود در طبیعت ارجحیت دارد. در مطالعه حاضر که با هدف بیان نوترکیب و ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی یک ال-گلوتامیناز جدید با منشأ سویه‌های بومی کشور انجام شده است، از بین چندین سویه که اخیراً ثبت جهانی شده‌اند و ژنوم کامل آنها تعیین توالی شده است سویه *Alteribacillus bidgolensis* که دارای دو نوع ژن ال-گلوتامینازی مختلف بود به‌عنوان سویه منشأ آنزیم مورد مطالعه انتخاب شد.

توالی با استفاده از ابزار Rare Codon Analysis در همان سایت تجزیه و تحلیل شد.

۲-۳ کلونینگ ژن گلوتامیناز

استخراج DNA ژنومی از باکتری *A. bidgolensis* انجام شد. سپس، پرایمرهای مربوط ژن ال-گلوتامیناز با کمک نرم افزار IDT oligo analyzer طراحی (جدول ۱) و توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. برای تکثیر ژن، واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با غلظت مواد به شرح زیر انجام شد: بافر PCR با غلظت ۱X، MgCl₂ با غلظت ۲/۵ میلی مولار، dNTPs با غلظت ۰/۶ میلی مولار، هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۰/۴ میکرومولار، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی. واکنش تکثیر ژن ها با برنامه زمانی شامل واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، تکثیر در ۸ چرخه به صورت واسرشت سازی به مدت ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، بسط آغازگر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، سپس تکثیر در ۲۷ چرخه به صورت واسرشت سازی به مدت ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه داخل دستگاه ترموسایکلر (شرکت BioRad) انجام شد. ژن ال-گلوتامیناز به همراه وکتور pET30-a با آنزیم های برشی

Xho I و *Eco*R I مورد برش قرار گرفتند. قطعات برش یافته روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند. پس از واکنش هضم آنزیمی، واکنش اتصال ژن گلوتامیناز در وکتور pET30-a توسط آنزیم T4 DNA ligase انجام شد. در نهایت وکتورهای دارای ژن انتخابی به باکتری مستعد *E. coli* سویه BL21(DE3) انتقال یافته و روی محیط LB Agar دارای آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. واکنش کلونی PCR بر روی تک کلونی های رشد یافته و با استفاده از آغازگرهای عمومی روی وکتور انجام شد. کلونی های مثبت در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در ۱۷۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. سپس، استخراج پلازمیدهای نوترکیب انجام شد.

۲-۴ بیان پروتئین

کلنی های BL21 حاوی پلازمیدهای نوترکیب، در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. سپس، ارلن ها بر روی انکوباتور متحرک در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۷۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ الی ۳ ساعت قرار داده شد. پس از رسیدن کدورت محیط کشت (OD₆₀₀) به ۰/۶، از محلول IPTG استریل با غلظت نهایی ۰/۱ الی ۰/۵ میلی مولار در زیر هود و در کنار شعله به محیط کشت اضافه شد و در انکوباتور متحرک در سه دمای ۲۰، ۲۶ و ۲۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن ال-گلوتامیناز از سویه *A. bidgolensis*

نام پرایمر	نوع پرایمر	توالی پرایمر	دمای (°C) TM
Glut-A.b-EcoRI-F	Forward	TTATATGAATTCATGAGCAGTCTTTTATTGAT	۵۵
Glut-A.b-XhoI-R	Reverse	TTATATCTCGAGTGAAAATATGCTCAAGCTATAT	۵۵

توالی که زیر آن ها خط کشیده شده است، جایگاه برشی آنزیم محدودالانتر می باشد.

۲-۶ خالص سازی پروتئین

برای تخلیص ال-گلوتامیناز که حاوی His-tag می باشد، از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل آگارز (شرکت Sigma) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا یک میلی لیتر از ژل نیکل وارد ستون شد و پس از شست و شوی ژل با آب مقطر و سپس به تعادل رساندن آن با بافر تعادل/ شست و شو (سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۰/۳ مولار و ایمیدازول ۱۰ میلی مولار)، مایع حاوی پروتئین های محلول در داخل ستون کروماتوگرافی قرار گرفت. با عبور آرام پروتئین ها از ژل، اتصال پروتئین مورد نظر با یون نیکل انجام می شود و به این ترتیب پروتئین دارای His-tag از مابقی پروتئین ها جدا می شود. در ادامه، ستون با بافر تعادل/ شست و شو شسته شد. در نهایت پروتئین متصل به ستون با استفاده از بافر جداکننده (سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار، سدیم کلرید ۰/۳ مولار و ایمیدازول ۳۰۰ میلی مولار) از ستون خالص شده و بر روی ژل SDS-PAGE ۱۱ درصد بررسی شد.

۲-۷ دیالیز پروتئین

برای حذف ایمیدازول استفاده شده در فرایند خالص سازی که مانع از واکنش رنگی نسلریزاسیون برای سنجش فعالیت آنزیم می باشد، دیالیز پروتئین انجام شد. در ابتدا کیسه دیالیز با منافذ ۱۴-۱۲ کیلودالتونی در محلول اتوکلا شده ۰/۹ درصد از NaCl شست و شو داده شد. در مرحله بعد کیسه دیالیز در بافر دیالیز ۵۰۰ میلی لیتری شامل Tris-HCl ۲۰ میلی مولار، NaCl ۲۰۰ میلی مولار، DTT ۱ میلی مولار، قرار داده شد و پروتئین خالص سازی شده به درون کیسه ریخته شد و به مدت چهار ساعت بر روی دستگاه استیرر در یخچال قرار گرفت.

۲-۸ غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد

برای تعیین مقدار پروتئین نمونه، در یک لوله مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه و ۹۰ میکرولیتر NaCl ۱۵۰ میلی مولار و ۱ میلی لیتر محلول برادفورد با هم مخلوط شد. پس از ۱۰

پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان القا، سلول ها رسوب داده شد و به رسوب حاصل، بافر لیز (Tris-HCl به میزان ۵۰ میلی مولار و ایمیدازول به میزان ۵ میلی مولار) حاوی ۳ میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم اضافه شد و سپس ورتکس شد. برای همگن سازی و لیز کامل رسوب از دستگاه سونیکاتور یا التراسونیک هموژنایزر استفاده شد. سپس، به ازای هر میلی لیتر بافر لیز، مقدار یک واحد DNase I برای حذف DNA آزاد شده از سلول و کاهش چسبندگی محلول به هر کدام از نمونه ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. پس از انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور، فاز رویی به عنوان پروتئین های محلول جدا شد و به رسوب نیز، لیز بافر حاوی اوره ۸ مولار اضافه و ورتکس شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداشته شد. بار دیگر سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۲۰۰۰ دور انجام شد و محلول رویی به عنوان فاز رسوب که حاوی پروتئین های نامحلول است، جدا شد. در نهایت سطح بیان پروتئین های موجود در فاز محلول و رسوب توسط الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید (SDS-PAGE، ۱۱ درصد) بررسی شد.

۲-۵ بیان محلول آنزیم با کمک چپرون های مولکولی

وکتور نو ترکیب حاوی ژن ال-گلوتامیناز به طور همزمان با وکتور pG-KJE8 (شرکت Takara) حاوی چاپرون های مولکولی GroES، GroEL، GrpE، Dnaj، Dnak باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) ترانسفورم شده و در محیط کشت حاوی کانامایسین (برای وکتور های نو ترکیب) و کلروآمفنیکل (برای پلازمید pG-KJE8) کشت داده شدند. القای بیان به روش ذکر شده در بالا انجام شد با این تفاوت که برای القای بیان چاپرون های مولکولی همزمان با تلقیح محیط، ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر ال-آرابینوز و ۵ نانوگرم بر میلی لیتر تتراسایکلین اضافه شد.

فعالیت آنزیم به روش گفته شده در بخش ۲-۹، در دماهای مختلف (۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد.

۲-۱۲ بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم در pH های مختلف (۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰) با استفاده از روش بیان شده در بخش ۲-۹، و بافر (Citric acid Sodium citrate) برای pH برابر ۵، بافر (K₂HPO₄: Glycine) برای pH برابر ۶، ۷ و ۸ و بافر (NaOH) برای pH برابر ۹ و ۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱ پیش‌بینی بیان بهینه ژن گلوتامیناز در *E. coli*

سه ویژگی شاخص انطباق کدونی (CAI)^۲، توزیع فراوانی کدونی (CFD)^۳ و درصد GC که تأثیر زیادی بر بیان پروتئین‌های هترولوگ در میزبان‌های مختلف از جمله *E. coli* دارند، با ابزار Rare Codon Analyzer در وبسایت GenScript ارزیابی شدند. نتایج آنالیز توالی ال-گلوتامیناز با استفاده از ابزار ذکر شده (جدول ۲) نشان داد که شاخص انطباق کدونی ۰/۷۷ می‌باشد. همچنین، مقدار GC مناسب در دامنه ۳۰ تا ۷۰ درصد است که این شاخص برای ژن ال-گلوتامیناز و پس از بهینه‌سازی ۵۲/۶۹ درصد می‌باشد. میزان توزیع فراوانی کدونی این ژن ۴ درصد است. (جدول ۲)، این در حالی است که مقدار ایده‌آل این شاخص برای بیان در میزبان *E. coli*، کمتر از ۳۰ درصد است.

۳-۲ کلونینگ ژن ال-گلوتامیناز

پس از استخراج DNA ژنومی از باکتری *A. bidgolensis* و طراحی و سنتز پرایمرهای مربوط به آن، واکنش PCR انجام شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده تکثیر ژن ال-گلوتامیناز می‌باشد (شکل ۱-الف).

دقیقه، جذب نوری نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA)^۱ و ضریب رقت، مقدار پروتئین نمونه مجهول به دست آمد.

۲-۹ بررسی فعالیت ال-گلوتامیناز

یکی از محصولات واکنش کاتالیتیک ال-گلوتامیناز، آمونیاک می‌باشد، پس میزان فعالیت ال-گلوتامیناز با اندازه‌گیری میزان آمونیاک آزاد شده توسط واکنش به روش نسلریزاسیون قابل سنجش می‌باشد [۱۷]. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر از ال-گلو تامین ۰/۰۴ مولار، ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۵ مولار با pH برابر ۸، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاوی آنزیم است که توسط آب مقطر است به حجم را ۲ میلی‌لیتر رسیده است. این مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار به پایان رسید.

در نمونه کنترل پیش از اضافه کردن آنزیم، تری کلرواستیک اسید اضافه شد تا مانع از فعالیت آنزیم شود. در ویالی حاوی ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شد و به آن ۰/۲ میلی‌لیتر معرف نسلر اضافه شد. سپس ویال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش انجام شد.

۲-۱۰ بررسی فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف

سوستر

فعالیت آنزیم به روش بیان شده، در غلظت‌های مختلف سوستر (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰ میلی مولار) به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد.

۲-۱۱ بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم

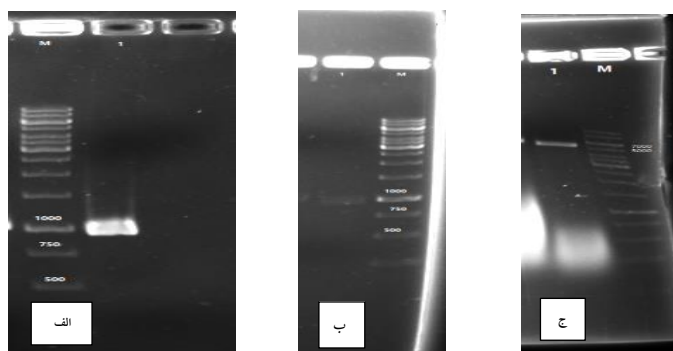
^۲Codon Adaptation Index

^۳Codon Frequency Distribution

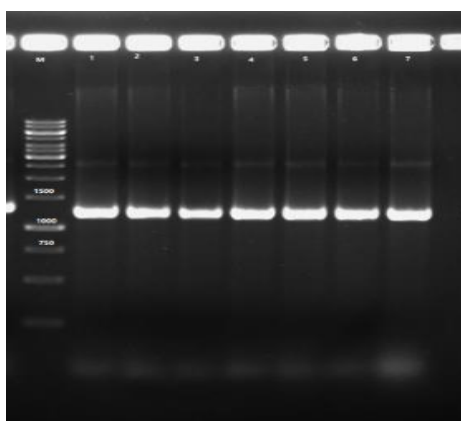
^۱ Bovin Serum Albumin

جدول ۲ نتایج تجزیه و تحلیل توالی ژن ال-گلوتامیناز با استفاده از ابزار آنالاین Rare Codon Analyzer

شاخص	بازه قابل قبول	
CAI	۰/۷۷	۰/۸ – ۱/۰
GC content	% ۵۲/۶۹	% ۳۰ – % ۷۰
CFD	% ۴	< % ۳۰



شکل ۱ مراحل کلونینگ ژن ال-گلوتامیناز؛ الف) مرحله PCR؛ M: مارکر 1kb DNA ladder، ۱: تکثیر ژن ال-گلوتامیناز؛ ب) هضم آنزیمی زیرواحدها توسط آنزیم‌های برشی *EcoR I* و *Xho I*؛ M: مارکر 1kb DNA ladder، ۱: محصول هضم آنزیمی ژن ال-گلوتامیناز؛ پ) محصول هضم آنزیمی پلازمید pET30a توسط آنزیم‌های برشی *EcoR I* و *Xho I*؛ ۱: پلازمید برش یافته pET30a، M: 1kb DNA ladder



شکل ۲ نتایج کلونی PCR ژن ال-گلوتامیناز؛ M: مارکر 1kb DNA ladder، ۱-۷: PCR حاصل از تک کلونی‌ها بعد از انتقال ژن ال-گلوتامیناز به وکتور pET30a

در طی واکنش الحاق متصل شدند. در نهایت محصول واکنش الحاق به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) مستعد (competent) منتقل شد و کشت سلول‌ها بر روی

در ادامه خالص سازی محصول PCR انجام و سپس ژن به همراه وکتور pET30a با آنزیم‌های *EcoR I* و *Xho I* برش خورده (شکل ۱- ب و ۱- پ) و داخل وکتورهای مربوطه

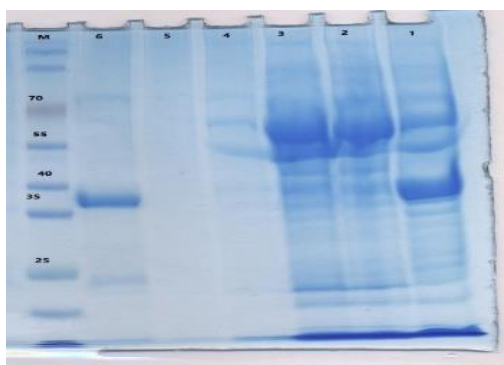
۳-۴ بررسی بیان محلول ال-گلوتامیناز با کمک چاپرون های مولکولی

بررسی بیان برای ال-گلوتامیناز که همزمان با وکتور pG-KJE8 ترانسفورم شدند، به روش ذکر شده در قبل انجام شد و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت بهترین بیان محلول آن مشاهده شد (شکل ۳). پروتئین بیان شده در اندازه محاسبه شده ۳۹ کیلودالتون بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شده و سپس تخلیص شد. در نهایت به دلیل تداخل ایمیدازول حاصل از خالص سازی در واکنش رنگی نسلریزاسیون دیالیز پروتئین انجام شد (شکل ۳).

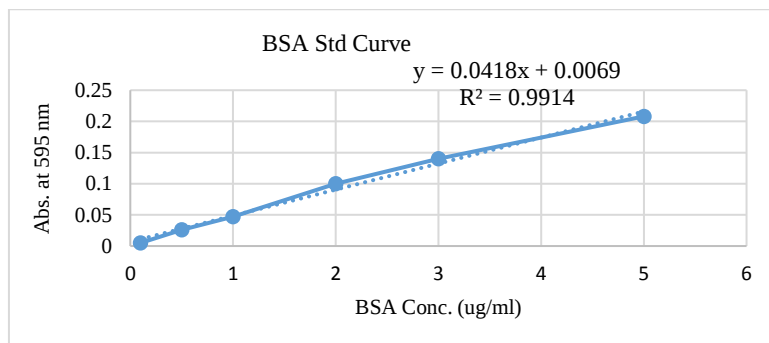
پلیت LB Agar حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین انجام شد. پس از انجام واکنش Colony PCR بر روی کلونی های منتخب با استفاده از آغازگرهای T7 Promoter و T7 Terminator، نتایج بر روی ژل آگارز تفکیک شد و وجود باند در اندازه های حدود ۱۲۰۰ جفت بازی نشان دهنده کلونینگ صحیح ژن درون وکتور بود (شکل ۲).

۳-۳ بررسی بیان پروتئین

از میان دماها و غلظت های مختلف IPTG آزمایش شده، در هیچ شرایط دمایی و با غلظت های مختلف IPTG بیان محلول حاصل نشد (نتایج الکتروفورز بیان های ناموفق اینجا نشان داده نشده است).



شکل ۳ SDS-PAGE ۱۱ درصد برای تفکیک پروتئین بیان شده ال-گلوتامیناز به صورت کوترانسفورم با وکتور چاپرونی در سویه *E. coli* BL21(DE3) با مقدار ۰/۳ میلی مولار IPTG و خالص سازی آن؛ ۱: فاز رسوب پروتئین؛ ۲: فاز محلول پروتئین بیان شده؛ ۳: محلول عبور داده شده از ستون. ۴ و ۵: به ترتیب مراحل ۱ و ۲ شستشو؛ ۶: پروتئین خالص شده.



نمودار ۱ نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی

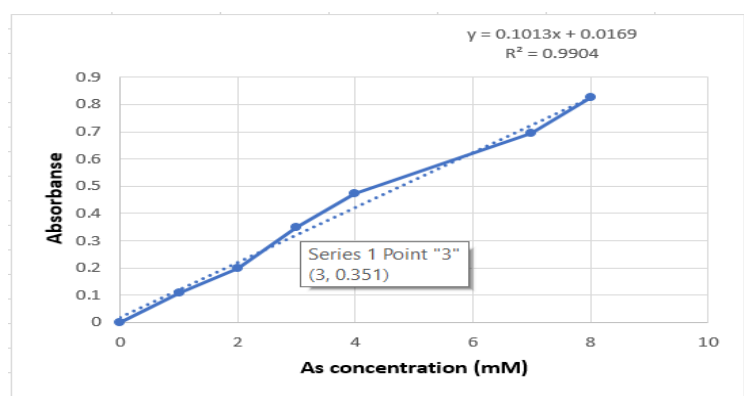
۳-۵ غلظت سنجی پروتئین

بر اساس نتایج اسپکتروفتومتری محلول خالص سازی شده پروتئین به روش برادفورد و بر اساس نمودار استاندارد BSA (نمودار ۱)، غلظت محلول حاوی پروتئین خالص شده ال-گلوتامیناز به میزان 0.37 ± 0.01 میکروگرم بر میکرولیتر به دست آمد. همچنین، نقطه ایزوالکتریک پروتئین بیان شده برابر با 5.64 محاسبه شد. آنزیم به صورت آزاد و بدون کونژوگه کردن در همه تست های آنزیمی استفاده شد.

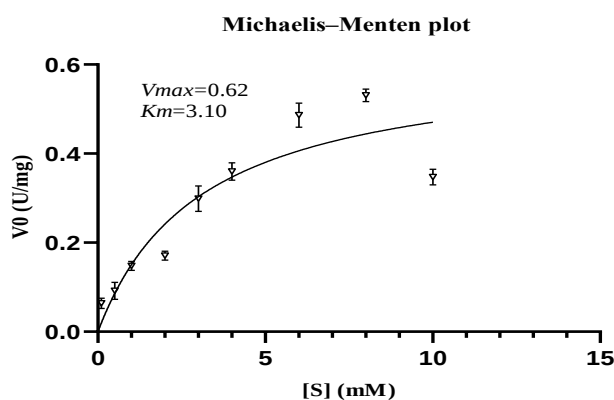
۳-۶ بررسی فعالیت آنزیمی ال-گلوتامیناز

نتایج داده های مربوط به غلظت های مختلف سوپسترا در فعالیت آنزیم در سه تکرار و با کمک سنجش میزان جذب

توسط دستگاه اسپکتروفتومتری را نشان می دهد. از غلظت 0.1 تا 8 میلی مولار فعالیت به صورت صعودی و در غلظت 10 میلی مولار، نزول نمودار نشان داده شده است که حاکی از آن است که غلظت های 10 میلی مولار و بالاتر از سوپسترا، موجب مهار فعالیت آنزیم می شود. با استفاده از منحنی استاندارد آمونیوم سولفات (نمودار ۲) و براساس مقادیر برآورد شده از نمودار میکائیلیس-متن (نمودار ۳) و نمودار لاینیویر-برک (نمودار ۴) مقدار V_{max} آنزیم 0.62 میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم آنزیم و K_m آنزیم 3.10 میلی مولار محاسبه شده است.

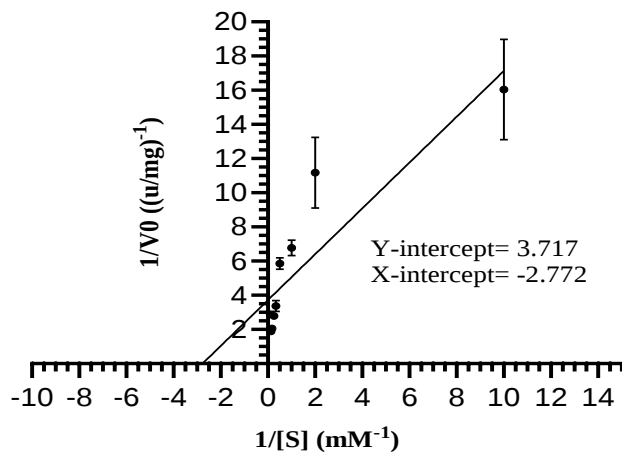


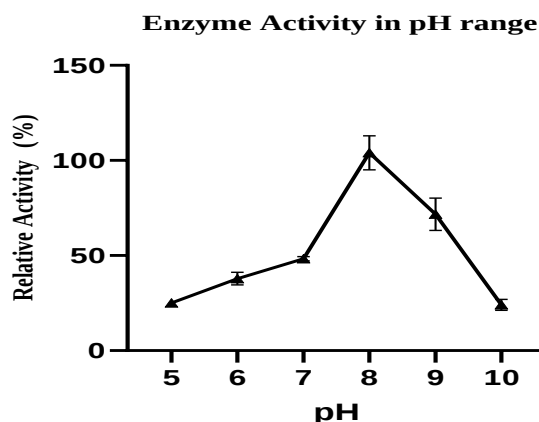
نمودار ۲ منحنی استاندارد آمونیوم سولفات



نمودار ۳ نمودار میکائیلیس-متن: محور X میلی مولار غلظت سوپسترا و محور Y، V_0 ال-گلوتامیناز بر حسب U/mg

Lineweaver-Burk plot





نمودار ۶ اثر تغییرات pH بر روی فعالیت نسبی ال-گلو تامیناز. محور X: pH. محور Y: فعالیت نسبی آنزیم

۴- بحث

ال-گلو تامیناز از طریق فرایند دآمیناسیون اسید آمینه ال-گلو تامین نقش مهمی در بیوسنتز متابولیت‌های نیتروژنی متنوع دارد [۲] و در چند دهه اخیر این آنزیم به علت این توانایی کاتالیکی خود در زمینه های مختلف از جمله پزشکی و دارویی، صنایع غذایی، بیوسنسورها بسیار مورد توجه واقع شده است [۱۸]. تولید پروتئین‌ها در اندازه کافی در واقع گام اول در مطالعه آنها و استفاده از آنها در زمینه کاربردهای مختلف می باشد. مطالعه آنزیم‌ها و استفاده از آنها اغلب نیازمند جداسازی آنها از اجزای سلولی می باشد. استفاده از آنزیم از منبع طبیعی آن، مستلزم فرایند خالص سازی می باشد. این فرایند معمولاً سخت و طاقت فرسا است و در نهایت میزان آنزیم به دست آمده بسیار کم و ناکافی می باشد [۱۹]. به همین دلیل، با استفاده از تکنیک DNA نو ترکیب پروتئین‌ها در سیستم‌های غیر مشابه سنتز می شوند، زیرا امکان به دست آوردن محصول کافی از آنها در منابع طبیعی آنها وجود ندارد. همچنین، تکنیک مذکور این امکان را فراهم می کند تا آنزیم‌هایی با ویژگی‌های مهندسی شده تولید شود [۲۰]. بنابراین، تولید پروتئین‌های نو ترکیب محلول و دارای عملکرد یکی از هدف‌های اصلی در زمینه بیوتکنولوژی می باشد [۲۱]. ژن

های کد کننده انواع متنوعی از ال-گلو تامینازها نیز با استفاده از همین تکنیک در میزبان‌های مختلف کلون شدند و پروتئین‌های نو ترکیب حاصل از آنها دارای ویژگی‌هایی مشابه و حتی ارتقا یافته نسبت به انواع وحشی آنزیم‌ها بوده است.

شاخص انتخاب کدونی (CAI) نشان دهنده تطابق فراوانی کدون ژن مورد نظر در میزبان برای اطمینان از میزان بیان پروتئین نو ترکیب است. هر اندازه که مقدار این شاخص به عدد یک نزدیک تر باشد، بیان ژن مطلوب تر را در میزبان نشان می دهد. اندازه این شاخص برای ال-گلو تامیناز، ۰/۷۷ نشان داده شده است (جدول ۲) که در این مورد نزدیک به محدوده قابل قبول می باشد. درصد GC توالی ژن در ایجاد ساختارهای ثانویه و همچنین ثبات mRNA تاثیر دارد و اندازه ایده آل آن بین ۳۰ تا ۷۰ درصد از محتوای ژن می باشد و چنانچه این درصد خارج از این محدوده قرار داشته باشد، می تواند بر کارایی فرایند رونویسی و ترجمه نقش داشته باشد. محتوای GC برای ال-گلو تامیناز، ۵۲/۶۹ درصد می باشد که در محدوده نرمال قرار دارد. میزان توزیع فراوانی کدونی (CFD) به طور ایده آل باید کمتر از ۳۰ درصد باشد که نشان دهنده کمتر بودن کدون های با فراوانی پایین تر است. کمتر بودن این شاخص می

تواند در میزان بیان تاثیر به سزایی داشته باشد. میزان این پارامتر برای ژن ال-گلوتامیناز ۴ درصد محاسبه شده است که از این لحاظ نیز در وضعیت قابل قبولی قرار دارد. بررسی این سه پارامتر ال-گلوتامیناز مورد بررسی در این مطالعه نشان می‌دهد که این ژن از لحاظ بیان در میزبان *E.coli* در شرایط مطلوبی قرار دارد.

یکی از دغدغه‌های موجود در زمینه تولید پروتئین به صورت نوترکیب، تشکیل ساختار سوم فعال آنزیم و محلول‌سازی آنها است. علت آن است که در سیستم بیانی *E. coli* وقتی القای بیان در دمای بالاتر از ۲۰ درجه سانتی گراد انجام می‌شود، پروتئین‌های بیان شده بدون تشکیل ساختار سوم فعال یا با تشکیل ساختار سوم ناقص، تمایل به تجمع پیدا می‌کنند و در قالب اجسام تجمعی^۴ در سلول رسوب می‌کنند و تجمعی از پروتئین‌های فاقد عملکرد را در سلول تشکیل می‌دهند. همچنین، سرعت بیان آنقدر زیاد است که زمان مناسب برای شکل‌گیری صحیح پروتئین وجود ندارد. برای جلوگیری از این مشکل در این مطالعه از وکتور تجاری pG-KJE8 که حاوی چاپرون‌های مولکولی DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES که در تشکیل ساختار سوم صحیح پروتئین نقش دارند، به صورت کوترانسفرم استفاده شد تا فرایند تشکیل ساختار سوم و محلول‌سازی آنزیم‌ها انجام شود.

V_{max} حداکثر میزان سرعت واکنشی است که آنزیم از خود در موقعیتی که از سوبسترا اشباع شده است نشان می‌دهد. V_{max} محاسبه شده در این مطالعه ۰/۶۲ میکرو مول بر دقیقه بر میلی گرم آنزیم می‌باشد. مطالعه پیشین انجام شده توسط Sinsuwan و همکاران [۲۲] بر روی بیان نوترکیب ال-گلوتامیناز سویه *Bacillus licheniformis*، V_{max} گزارش شده ۵۷۹/۴۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم آنزیم بوده است و در مطالعه‌ی Nadeem و همکاران [۲۳] بر روی بیان نوترکیب ال-گلوتامیناز از سویه *Geobacillus*

thermodenitrificans DSM-465 میزان V_{max} ۲۳۸/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم آنزیم گزارش شده است. در مقایسه با مطالعات پیشین انجام شده V_{max} ال-گلوتامیناز در این مطالعه بسیار پایین است. یکی از دلایل احتمالی این میزان پایین سرعت آنزیم می‌تواند ناپایداری شدید سوبسترا باشد که میزان پیش ماده کافی در دسترس آنزیم را به شدت کاهش می‌دهد. بنابراین، برای دسترسی به سوبسترای مناسب برای سنجش فعالیت آنزیمی در این مطالعه پنج منبع مختلف سوبسترا بررسی شده است و تنها در یک مورد نتیجه حاصل شده است.

K_m غلظتی از سوبسترا است که در آن سرعت واکنش آنزیم به نصف V_{max} می‌رسد. K_m ال-گلوتامیناز در این مطالعه، ۳/۱۰ میلی مولار محاسبه شده است که نشان دهنده تمایل بالای آنزیم به سوبسترا می‌باشد. در مطالعات پیشین انجام شده توسط Sinsuwan و همکاران [۲۲] میزان K_m آنزیم ۱۱۱/۱۵ میلی مولار گزارش شده است. همچنین، در مطالعه انجام شده توسط Nadeem و همکاران [۲۳]، مقدار K_m آنزیم ۱۰۴ میلی مولار گزارش شده است.

برای بررسی دما و pH بهینه برای فعالیت ال-گلوتامیناز، سنجش فعالیت آنزیمی در بازه دمایی ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد و بازه pH ۵ تا ۱۰ بررسی شد. همانطور که در نمودار ۵ نشان داده شده است در تمام این گستره دمایی فعالیت آنزیمی همچنان وجود دارد. در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بیشترین میزان فعالیت به صورت نسبی مشاهده شده است که در واقع دمای بهینه‌ی فعالیت ال-گلوتامیناز می‌باشد. در حالی که، این آنزیم در گستره دمایی ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتی گراد همچنان ۵۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده است. دمای بیش از ۶۰ درجه سانتی گراد در این مطالعه بررسی نشد، زیرا سوبسترای ال-گلوتامین در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتی گراد به شدت ناپایدار است و امکان سنجش فعالیت آنزیم فراهم نیست. مطالعه بر

⁴ Inclusion Bodies

حالی که، میزان V_{max} حاصل از این آنزیم ۰/۶۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم آنزیم گزارش شده است که با توجه به مطالعات پیشین مقدار کمی می باشد.

۶- منابع

- [1] Khalil MS, Moubasher MH, El-Zawahry MM, Miche MM. Evaluation of antitumor activity of fungal L-glutaminase produced by Egyptian isolates. *Lett. Appl. NanoBioScience* 2020; 9: 924–930.
- [2] Orabi H, El-Fakharany E, Abdelkhalek E, Sidkey N. Production, optimization, purification, characterization, and anti-cancer application of extracellular L-glutaminase produced from the marine bacterial isolate. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2020; 50: 408–418.
- [3] Orabi HM, El-Fakharany EM, Abdelkhalek ES, Sidkey NM. L-Asparaginase and L-glutaminase: Sources, production, and applications in medicine and industry. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2019; 179–190.
- [4] Masisi BK, El Ansari R, Alfarsi L, Rakha EA, Green AR, Craze ML. The role of glutaminase in cancer. *Histopathology* 2020; 76: 498–508.
- [5] Pandian SRK, Deepak V, Nellaiah H, Sundar K. PEG–PHB-glutaminase nanoparticle inhibits cancer cell proliferation in vitro through glutamine deprivation. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 2015; 51: 372–380.
- [6] Dhankhar R, Gupta V, Kumar S, Kapoor RK, Gulati P. Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104: 2857–2869.
- [7] Kumar SR, Chandrasekaran M. Continuous production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas* sp BTMS-51 in a packed bed reactor. *Process Biochem.* 2003; 38: 1431–1436.
- [8] Amobonye A, Singh S, Pillai S. Recent advances in microbial glutaminase production and applications—a concise review. *Critical Reviews in Biotechnology* 2019; 39: 944–963.
- [9] Abu-Tahon MA, Isaac GS. Purification, characterization and anticancer efficiency of L-glutaminase from *aspergillus flavus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2019; 65: 284–292.

روی بیان نوترکیب ال-گلوتامیناز استخراج شده از سویه *Bacteroides helcogenes* نشان داد که دمای بهینه آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بوده و آنزیم تا دمای ۷۰ درجه سانتیگراد فعالیت می باشد [۲۴]. در مطالعه Orabi و همکاران نیز دمای مطلوب برای فعالیت ال-گلوتامیناز نوترکیب ۴۰ درجه سانتیگراد گزارش شده است [۲]. در حالی که، مطالعه بررسی ال-گلوتامیناز نوترکیب استخراج شده از *B. licheniformis* دمای بهینه این آنزیم را ۳۰ درجه سانتیگراد گزارش داده است [۲۲]. در نمودار ۶ میزان فعالیت نسبی آنزیم در بازه pH ۵ تا ۱۰ نشان داده شده است. با وجود اینکه ال-گلوتامیناز در این گستره از pH فعال می باشد، pH بهینه ی فعالیت این آنزیم ۸ است که بیشترین میزان فعالیت نسبی را نشان می دهد. در حالی که، در بازه pH برابر با ۷ تا ۹/۵ همچنان بالای ۵۰ درصد از فعالیت آنزیمی خود را حفظ کرده است. Orabi و همکاران و Sinsuwan و همکاران بازه بهینه pH برای فعالیت ال-گلوتامینازهای نوترکیب استخراج شده از *B. licheniformis* و *Bacillus subtilis* OHM11 را ۷ تا ۹ گزارش کرده اند [۲۲ و ۲۳]. در حالی که، در مطالعه Horstmann و همکاران بازه pH بهینه ال-گلوتامیناز نوترکیب استخراج شده از *B. helcogenes* در بازه ۵ تا ۶ گزارش شده است [۲۴].

۵- نتیجه گیری

با توجه به کاربرد روز افزون ال-گلوتامیناز، دسترسی به منبعی از آن که ویژگی هایی متمایز داشته باشد مزیت محسوب می شود. در این مطالعه ال-گلوتامیناز از سویه بومی *A. bidgolensis* با استفاده از حامل بیانی pET30a و وکتور تجاری pG-JKE در میزبان *E. coli* به صورت محلول بیان و خالص سازی شد. دمای بهینه فعالیت این آنزیم ۴۰ درجه سانتیگراد و pH بهینه ۸ می باشد. میزان K_m ال-گلوتامیناز ۳/۱۰ میلی مولار است که نسبت به موارد گزارش شده در مطالعات قبلی قابل قبول است. در

- [20] El-Gendy MMAA, Taha TM, Abo-Dahab NF, Hassan FSM. Process optimization of l-glutaminase production; a tumour inhibitor from marine endophytic isolate aspergillus sp. ALAA-2000. *Int. J. PharmTech Res.* 2016; 9: 256–267.
- [21] Ferrer-Miralles N, Saccardo P, Corchero JL, Xu Z, García-Fruitós E. General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Insoluble Proteins Methods Protoc.* 2015; 1–24.
- [22] Sinsuwan S, Yongsawatdigul J, Chumseng S, Yamabhai M. Efficient expression and purification of recombinant glutaminase from *Bacillus licheniformis* (GlsA) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2012; 83: 52–58.
- [23] Shah L, Nadeem MS, Khan JA, Zeyadi MA, Zamzami MA, Mohammed K. Recombinant l-glutaminase obtained from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465: characterization and in silico elucidation of conserved structural domains. *RSC Adv.* 2019; 9: 4258–4267.
- [24] Horstmann G, Ewert J, Stressler T, Fischer L. A novel protein glutaminase from *Bacteroides helcogenes*—characterization and comparison. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104: 187–199.
- [10] Unissa R, Sudhakar M, Sunil Kumar Reddy A, Naga Sravanthi K. A REVIEW ON BIOCHEMICAL AND THERAPEUTIC ASPECTS OF GLUTAMINASE. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2014; 5: 4617.
- [11] Srivastava N. Production of food-processing enzymes from recombinant microorganisms. In: eds. Elsevier. 2019; 739–767.
- [12] Wakayama M, Nagano Y, Renu N, Kawamura T, Sakai K, Moriguchi M. Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *J. Ferment. Bioeng.* 1996; 82: 592–597.
- [13] Huerta-Saquero A, Calderon J, Arregum R, Calderon-Flores A, Duran S. Overexpression and purification of *Rhizobium etli* glutaminase a by recombinant and conventional procedures: a comparative study of enzymatic properties. *Protein Expr. Purif.* 2001; 21: 432–437.
- [14] Koibuchi K, Nagasaki H, Yuasa A, Kataoka J, Kitamoto K. Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 54: 59–68.
- [15] Ito K, Umitsuki G, Oguma T, Koyama Y. Salt-tolerant and thermostable glutaminases of *Cryptococcus* species form a new glutaminase family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011; 75: 1317–1324.
- [16] Didari M, Amoozegar MA, Bagheri M, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Bacillus persepolensis* as *Alteribacillus persepolensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012; 62: 2691–2697.
- [17] Isono M. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. 1973; 85–99.
- [18] Irajie C, Mohkam M, Nezafat N, Hosseinzadeh S, Aminlari M, Ghasemi Y. In Silico Analysis of Glutaminase from Different Species of *Escherichia* and *Bacillus*. *J Med Sci* September 2016; 41:
- [19] Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli* : A 5-year update. 2019; 28: 1412–1422.

Cloning, Recombinant Expression and Evaluation of Biochemical Properties of L-Glutaminase from *Alteribacillus bidgolensis*

Saba Moafi¹, Seyed Abdolhamid Angaji^{2*}, Hossein Ghafouri³, Sajjad Sarikhan^{4*}

1 MSc. , Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2 Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

3 Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Guilan University, Rasht, Iran

4 Research Associate, DNA and Genomic Data Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran

sarikhan@acecr.ac.ir, angaji@khu.ac.ir

Receipt: 2023/09/19

Accepted: 2025/06/30

Abstract

L-glutaminases (L-glutamine amidohydrolase, 3.5.1.2) belong to the superfamily of serine-dependent β -lactamases and penicillin-binding proteins. L-glutaminases have received much attention in the last few decades due to their catalytic ability to deaminate glutamine to glutamic acid and ammonia; a property that has made them valuable in different industrial applications, especially in medicine. Research on glutaminase has progressed during the last four decades, though slowly in comparison to other industrially important enzymes. The relatively high cost of glutaminase is one of the major drawbacks hindering its industrial applications. The current production levels of glutaminase are also insufficient for the required clinical trials to facilitate its medical uses and for other applications. The purpose of this study is the solubilized recombinant expression and functional assay of L-glutaminase from *Alteribacillus bidgolensis* (P4BT) in an *E. coli* BL21 (DE3) expression system. In this study, the L-glutaminase gene was successfully cloned with the pET30a expression vector in the *E. coli* BL21 (DE3) expression system. Solubilized expression was achieved with the aid of the pG-KJE8 vector, which contains molecular chaperones. Ultimately, the specific activity of the purified and dialyzed enzyme was assessed at 40°C and pH 8, yielding an enzymatic activity of 0.53 ± 0.01 U/mg at a substrate concentration of 8 mM. The K_m value for L-glutaminase was calculated at 3.10 mM, with a V_{max} of 0.62 U/mg.

Keywords: Cloning, Recombinant Expression, L-glutaminase, *Alteribacillus bidgolensis*, Chaperone