الانتاج المطعم و الخصائص الحركية لأنزيم ل-اسباراجينيز من جيوباسيلس DSM-465

إعداد

حامد بن محمد السلمي

تقدم هذه الرسالة استكمالًا لمتطلبات درجة الماجستير في علوم الكيمياء الحيوية

إشراف

د. محمد شاهد نديم

استاذ مساعد

قسم الكيمياء الحيوي

د. مصطفى عدنان زيادي

استاذ مساعد

قسم الكيمياء الحيوية

قسم الكيمياء الحيوية – كلية العلوم
جامعة الملك عبدالعزيز
جدة – المملكة العربية السعودية

١٤٤١هـ / ٢٠١٩م

المستـخلـص

يستخدم إنزيم الاسباراجينيز في المجالات الصناعية والدوائية على نطاق واسع. يعتبر إنزيم اسباراجينيز هو المسؤول عن تحويل اسبارجين إلى حمض الأسبارتيك والأمونيا في التفاعلات الغير عكسية. يتواجد انزيم اسباراجينيز بشكل واسع في الميكروبات والحيوانات والنباتات. ولقد استخدم إنزيم الاسباراجينيز ذا المصدر البكتيري بشكل كبير في معالجة سرطان الدم والاورام الليمفاوية في مرحلة الطفولة. ومع ذلك فان نشاط الجلوتومينز لهذا الإنزيم يسبب أعراض جانبية حقيقية أدت إلى البحث عن إنزيم ذا تخصصية عالية وأكثر استقرارية. في هذه الدراسة الجين المتكون من 972 شفره جينيه لـ 323 حمض أميني تم تكثيره عن طريق تقنية الـ PCR (تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل) من بكتريا *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465

ثم باستخدام تقنية T/A للإستنساخ تم ربط وتكثير الجين في البلازميد PTZ57RT وتم إعادة تكثيره في البلازميد PET22b . إنزيم الاسباراجينيز المنتج عن طريق سلالة بكتيريا القولون

شفرة RIL *Escherichia coli* BL21 (DE3) كبروتين خارجي عند IPTG 0.3 mM ودرجة حرارة 30° تم تنقيته عن طريق تقنية الكروموتوغرافي ذي التبادل الايوني باستخدام عمود الفصل المزود بمادة السفيدكس column. وقد ظهر الانزيم المنقى بوزن جزيئي قيمته حوالي 36 KDa عن طريق تقنية الهجرة الكهربائية لفصل البروتين SDS-PAGE. وأظهرت النتائج ان النشاط المتخصص لهذا الانزيم المنقى هو 1650وحدة لكل مل جرام من البروتين مع نشاط جلوتومينيز 5% تقريبا. كما تبين أن أفضل نشاط لهذا الانزيم هو عند درجة حرارة 75° وعند اس هيدروجيني 9. كذلك ظهرت قيمة KM (ثابت ميكالس) لانزيم اسبارجينيز بمقدار 5.9 mM للاسبرجين. كما أظهرت النتائج الحاسوبية in slico أن هذا الإنزيم يوجد في صورة هوموتيترامير. تم انتاج هذا الانزيم ودرست خصائصه في هذه الدراسة التي تظهره كمرشح محتمل لمعالجة سرطان الدم.

Recombinant production and kinetic properties of L-asparaginase

from *Geobacillus* DSM-465

By

Hamed Mohammed Alsulami

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the award of degree of Master of Science in Biochemistry

Supervised By

Dr. Muhammad Shahid Nadeem

Assistant Professor

Department of Biochemistry

Dr. Mustafa Adnan Zeyadi

Assistant Professor

Department of Biochemistry

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH-SAUDI ARABIA
1441 H – 2019 G

ABSTRACT

Enzymes have been widely used in various industries including the pharmaceutical industry. L-asparaginase is an enzyme responsible to convert L-Asparagine to L-Aspartic acid and ammonia in a non-reversible reaction. The enzyme is universally found in animals, microbes, and plants. The enzyme from bacteria has been widely applied for the treatment of juvenile lymphomas and leukaemia. However, the enzyme often exhibits some activity against L-Glutaminase which can cause serious side-effects. The variation in enzyme's affinity with glutamine triggers a research for very asparagine specific and highly stable enzyme. In this investigation the gene consisting of 972 bp coding for 323 amino acids was PCR amplified from the genomic DNA of *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465. The gene was T/A cloned in plasmid pTZ57RT, the gene fragment was further sub-cloned in pET22b expression vector. Recombinant of L-asparaginase was produced in *E. coli* strain BL21 (DE3) RIL codon plus as recombinant protein under 0.3 mM IPTG at 30◦C. The enzyme was purified by ion-exchange chromatography based on DEAE-Sephadex colum. The purified enzyme exhibited a molecular weight of about 36 kDa on SDS-PAGE. Specific activity of purified recombinant asparaginase was 1650 U per mg of protein with about 5% L-Glutaminase activity. Optimal enzyme activity was found at 75ºC and pH 9. It exhibited a KM value of 5.9mM for L-asparagine. The enzyme was found to exist as a homotetramer by in silico studies, with estimated MW of 140 kDa ish. The enzyme produced and characterized in the present study offers a potential candidate for the treatment of leukaemia.