بهینه سازی فرایند تخمیر و تخلیص آنزیم ۲A-پروتئینازنوترکیب

بهرامی علی*[1] ،نصیری محمدعلی[1]،مقصودی نادر[1]

۱- تهران ، مرکز تحقیقات علوم وفن آوری زیستی، گروه مهندسی بیوشیمی

First Author Email : Shian۷ir@yahoo.com

چکیده

بهترین ترکیب محیط کشت برای باکتری **E.coli BLR (DE۳) plysS [PET۲۲b + ۲APRO]** شامل ۱۵ g/l عصاره مخمر،۱۰ g/l پپتون و ۵ g/l کلرید سدیم بدست آمد. سپس سینتیک رشد باکتری و اثر القاء برای تولید آنزیم ۲A- پروتئیناز در فرمانتور همزندار بررسی شد. مشخص شد که القاء کشت با ترکیب IPTG با غلظت ۱ میلی مولاردر دانسیته سلولی $OD_{۶۰۰nm}$=۰،۷ بهترین شرایط القاء می‌باشد. در ادامه پس از لیز سلولی و تهیه انکلوژن بادی نسبتا خالص ریفولدینگ و خالص سازی ۲A- پروتئیناز در یک مرحله با استفاده از کروماتوگرافی تغویض یونی Q- سفارز و با خلوص بیش از ۹۵٪ بدست آمد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی ; کروماتوگرافی ; تخمیر; ۲A-پروتئیناز

مقدمه:

سویه‌های مختلف اشرشیاکلی (**E.coli**) برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. یکی از علل استفاده از این باکتری توانایی تولید با دانسیته سلولی بالا و در نتیجه غلظت بالای محصول تولیدی است. علت مهم دیگر این است که این باکتری از نظر ژنتیک، فیزیولوژی و تخمیر یک میکروارگانیسم شناخته‌شده می‌باشد و به همین دلایل بعنوان یک میزبان مفید برای تولید بسیاری از پروتئین‌ها استفاده می‌شود [۱].

۲A- پروتئیناز آنزیمی است که نقش کلیدی در عفونت زایی ویروس **CVB۳** و تکثیر آن ایفاء می‌کند. این آنزیم با شکستن فاکتور شروع ترجمه **eIF۴G** ، روال عادی سنتز پروتئین سلولی را مختل می‌کند[۲و۳]. تخلیص ۲A- پروتئیناز، امکان طراحی و انجام آزمایشات **InVitro** را جهت درک مکانیسم مولکولی صدمات سلولی در عفونت‌های ویروسی و نیز درک بهتر ترجمه در فرایند سلول‌های یوکاریوت مهیا می‌کند. همچنین با مشخص شدن نحوهٔ عملکرد این آنزیم می‌توان داروهای ضدویروسی مناسبی را طراحی کرد. در این تحقیق از باکتری **E.coli** حاوی ژن ۲A- پروتئیناز استفاده شده، که این باکتری در مرکز فن‌آوی زیستی تهیه شده است.

بهینه سازی محیط کشت در فرمانتور ناپیوسته، معمولترین و ساده‌ترین روش افزایش بهره‌دهی کلی تولید پروتئین نوترکیب است. و غالباً می‌توان با کمک همین محیط کشت بهینه در فرایند تخمیر ناپیوسته مقدار مورد نیاز پروتئین نوترکیب را فراهم کرد، بدون اینکه نیاز به اجرای فرایندهای پیچیده‌تر باشد. هرچند فعالیت‌های اندکی در این رابطه گزارش شده است. کلید توسعه پروسه‌های میکروبی با باکتری نوترکیب، بهینه سازی بهره‌دهی کلی فرایند تخمیر (**Overall productivity**) ، یعنی نسبت محصول نهایی در واحد حجم به زمان می‌باشد [٤]. برای سویه‌های E.coli نوترکیب که پروتئین‌های داخل سلولی تولید میکنند، بهره‌دهی کلی بالا نیازمند تولید میکروارگانیسم با دانسیته سلولی بالا و بهره‌دهی ویژه بالا (**SpecificProductivity**) یعنی نسبت محصول به واحد وزن خشک سلول در حداقل زمان فرایند تخمیر می‌باشد[۵]. یکی از فاکتورهای خیلی مهم در بیان پروتئین‌های نوترکیب