پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۶۲، بهار ۱۳۸۳

تولید و تخلیص نسبی Streptavidin از محیط کشت باکتری توسط کروماتوگرافی تعویض یونی بوسیله DEAE – سلولز

رشید جامعی، منوچهر میرشاهی و حسین نادری منش،

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش:اسفند ماه ۱۳۸۲

چکیده

Streptavidin (SA) پروتئینی است که توسط *Streptomyces avidini* ترشح شده و مرکب از چهار زیر واحد یکسان می‌باشد.هر کدام از این زیر واحدها با تمایل زیادی می‌توانند به یک ملکول بیوتین متصل شوند. در پژوهش حاضرشرایط کشت باکتری در محیط‌های کشت معین (B) و (A) و نامعین (LB و LB + آسپاراژین) ، و نیز مقدار پروتئین ترشح شده توسط آن مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا SA موجود در محیط کشت باکتری با سولفات آمونیم تغلیظ شد و سپس با استفاده از ستون DEAE – سلولز به طورنسبی خالص گردید. بررسی درجهٔ خلوص پروتئین توسط SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین شرایط کشت در محیط LB به مدت ۱۰ روز و دمای ۳۲ درجه سانتیگراد می باشد و میزان SA خالص شده در این روش حدود ۱۳ میلی گرم در لیتر بود و SA خالص شده را می توان مستقیماً مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی : استرپت آویدین، ***Streptomyces avidini*** ، تخلیص، DEAE – سلولز

Pajouhesh & Sazandegi No:62 pp: 21-26

Production and partial purification of Streptavidin(SA) from bacterial supernatant by DEAE-cellulose ionexchange chromatography

By: R. Jameei,M. Mirshahi and H. Naderimanesh Department of Biochemistry, Faculty of Basic Science, University of Tarbiat Modarres.

Streptavidin (SA) is a protein secreted by *Streptomyces avidini*. It has four subunits and each subunit has high affinity for biotin. In the present research ,we have analysed the effect of the defined (A&B) and undefined (LB&LB+Asn) culture media on the growth of *S.avidini* and the amount of protein secreted.SA in bacterial supernatant was concentrated with ammonium sulfate and then partially purified using a DEAE-cellulose column. The purity of SA was evaluated by SDS-PAGE and immunoblotting. Our results showed that the best culture conditions was in LB medium at 32°C for ten days where the yield of SA was about 13mg/l and the purified SA could be used directly .

Keywords:Streptavidin,*Streptomyces avidini*,Purification,DEAE-cellulose

مقدمه

مطالعه در مورد جنبه های مختلف پروتئین SA[1] ازسال ۱۹۶۳ آغاز شده است. اولین مطالعات به وسیلهٔ Stapley و همکاران(۱۷)با کشت باکتری *Streptomyces avidini* در محیط کشت آبگوشت[2] انجام شد. آنها در بررسی هایشان دریافتند که محصول تولید شده به وسیلهٔ این باکتری ، قسمتی از ترکیب آنتی بیوتیک توأمان-MSD[3] ۲۳۵ می باشد که می تواند هم در محیط کشت طبیعی با توان تغذیه‌ای بالا و هم در محیط کشت مصنوعی با توان تغذیه‌ای پایین تولید شود.

Chaiet و همکاران (۶) در مطالعاتشان دریافتند که آنتی بیوتیک مذکور دارای دو جزء توأمان است: جزء کوچک با وزن مولکولی کمتر از ۴۰۰ دالتون که در محیط کشت استفاده شده از نظر شیمیایی فعال بوده و قادر به مهار سنتز بیوتین به وسیلهٔ باکتریهای گرم منفی است ، جزء دیگر این آنتی بیوتیک پروتئین بزرگی با وزن ملکولی حدود ۶۰۰۰۰ دالتون می باشد و چون جزء اخیر مانند آویدین سفیدهٔ تخم مرغ با تمایل شدید به بیوتین خارج سلولی متصل می شود ، آن را SA نامیدند.

SA مانند آویدین دارای چهارزیر واحد یکسان بوده که هر زیر واحد آن دارای یک مکان اتصال برای بیوتین میباشد.میل ترکیبی بالای آن بابیوتین(M^{-1} ۱۰[15])و پایداری ترکیب SA – بیوتین به کاربردهای بسیار زیاد این سیستم در زمینه های مختلف منجر شده است . این سیستم به عنوان ابزار اصلی برای جداسازی (درکروماتوگرافی میل ترکیبی[4])، جایابی[5](درسیتوشیمی میل ترکیبی[6] و فنآوری بلوتینگ[7])وتشخیص(درسنجشهای ایمنی ، آسیب شناسی بافتی و پروبهای ژن[8]) مورد استفاده قرارگرفته است (۹،۱۱ ، ۱۹). باتوجه به کاربردهای مذکور واستفادهٔ گستردهٔ این پروتئین وکونژوگه[9]های آن درآزمایشگاههای تشخیص طبی و مراکز تحقیقاتی دنیا و با عنایت به ناشناخته بودن آن درمجامع علمی و مراکزتحقیقاتی داخل، لزوم انجام تحقیقی درمورد آن احساس می شد .لذا در تحقیق حاضر ابتدا با انتخاب چهار محیط کشت مختلف وکشت *S.avidini* درآنها،بهترین محیط کشت از نظر تولید مقادیر بیشتر SA با مقایسه ضخامت باند های پروتئین توسط الکتروفورز به صورت کیفی مشخص شد و سپس با کشت باکتری مزبور به صورت انبوه در این محیط کشت ، SA ترشح شده با کروماتوگرافی تعویض یونی به طور نسبی خالص گردید.به امید اینکه تحقیق حاضر راه گشائی برای انجام تحقیقات گسترده‌تر بر روی این پروتئین باشد .

مواد و روشها

مواد

S.avidini از ATCc ۲۷۴۱۹[10] تهیه شد، تریپتون و عصارهٔ مخمرساخت شرکت DIFCO بود،DEAE[11] سلولز، IgG بیوتینه بامنشأ موشی، IgG + IgM با منشأ خرگوشی کنژوگه شده با پراکسیداز و مارکر SA (با وزن ملکولی ۶۰۰۰۰ دالتون) از SIGMA و بقیه مواد مورد استفاده درتهیهٔ محیطهای کشت،تخلیص ،الکتروفورز و ایمونوبلوتینگ[12] ازMERCK تهیه شدند .

کشت باکتری

ابتدا مخلوط نمکها وعناصر نادر(۵)به صورت زیر تهیه گردید :

اسیدبوریک ۵۰۰گرم، سولفات مس آبدار۴۰میکروگرم،یدید پتاسیم ۱۰۰میکروگرم،کلرید آهن آبدار ۲۰۰میکروگرم،سولفات منگنز آبدار ۴۰۰ میکروگرم،مولیبدات سدیم آبدار ۲۰۰میکروگرم،سولفات روی آبدار ۴۰۰میکروگرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4) ۱ گرم، سولفات منیزیم آبدار ۰/۵گرم ،کلرید سدیم ۰/۱ گرم،وکلریدکلسیم آبدار ۰/۱ گرم.همه این مواد در هاون چینی به خوبی مخلوط شدند.محیط های کشت به صورت زیرتهیه شدند:

الف) محیط کشت مایع مصنوعی A : مخلوط نمکها و عناصرنادر ۱/۷ گرم ، L-آسپاراژین ۷ گرم ، گلوکز ۱۰ گرم و فسفات هیدروژن پتاسیم ($KHPO_4$) ۱ گرم. حجم این مواد با آب دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده شد. pH محلول حاصل بعداز اتوکلاو ۶/۵ بود.

ب) محیط کشت مایع مصنوعیB: موادموجود درمحیط کشت مایع مصنوعیA به اضافهٔ: فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۱ گرم ، سولفات منیزیم آبدار ۰/۵ گرم ، کلرید سدیم ۰/۱ گرم و کلرید کلسیم آبدار ۰/۱ گرم . حجم مواد مزبور با آب دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده شد. pH این محیط کشت بعداز اتوکلاو ۶/۱ بود.

ج) محیط کشت LB[13] : تریپتون ۱۰ گرم ، عصارهٔ مخمر ۵ گرم و کلرید سدیم ۵ گرم. حجم مخلوط به یک لیتر رسانده شد و pH محلول حاصل بعداز اتوکلاو ۷/۱ بود.

د) محیط کشت LB+آسپاراژین: ۷ گرم L- آسپاراژین به مواد موجود در محیط کشت LB اضافه گردید و حجم محیط کشت به یک لیتر رسانده شد.pH این محیط کشت بعد از اتوکلاو۷/۳ بود.اتوکلاو محیط های کشت به مدت ۱۵دقیقه و در فشار۱۵ lb انجام شد(۱۸،۸،۵).

برای کشت ازسویهٔ *S.avidini* ۲۷۴۱۹ استفاده شدکه همین سویه قبلاً بوسیلهٔ Cazin وهمکاران(۵) نیز استفاده شده است. محیط های کشت مصنوعی A و B قبلاً برای کشت *S.avidini* به وسیلهٔ ایشان استفاده شده اند ، ولی محیط های کشت مغذی LB و LB + آسپاراژین اولین بار برای کشت باکتری مزبور در این تحقیق استفاده گردیدند.برای تهیهٔ محیط کشت پیش کشت به منظور تلقیح درمحیطهای کشت ،۰/۴ میلی لیترازسوسپانسیون باکتری خریداری شده در کنار شعله در ۱۰میلی لیتر محیط کشتLB استریل تلقیح شد. لوله داخل انکوباتور(دما ۳۲ و سرعت همزن ۱۵۰ دور در دقیقه) قرار داده شد . بعد از ۲۴ ساعت ،رشد باکتری مشاهده گردید(۱۵).برای کشت باکتری در حجم زیاد به هر ارلن یک لیتری، ۴۰۰ میلی‌لیتر از محیطهای کشت مذکور اضافه شد. پس از انجام اتوکلاو درکنار شعله به هر ارلن ۱۷میلی لیتراز محیط کشت حاوی باکتری اضافه گردید.ارلنها داخل انکوباتور(دما ۳۲ و سرعت همزن ۱۵۰ دور در دقیقه) قرارگرفتند.با توجه به گزارش Cazin و همکاران (۵) روز دهم که حداکثر رشد لگاریتمی این باکتری است ، ارلنها از انکوباتورخارج گردیدند و به هر ارلن برای توقف رشد باکتری وجلوگیری ازآلودگی به غلظت ۱٪ (۴گرم)آزید سدیم اضافه شد. سپس محتویات ارلنها بوسیلهٔ قیف بوخنر با صافی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلاء صاف گردید

وهرمحیط کشت صاف شده به صورت جداگانه باسولفات آمونیوم ۸۰٪ طی مراحل زیرتغلیظ شد(۵، ۱۸):حجم مساوی از محیط های کشت در ۱۵۰۰g به مدت ۲۰دقیقه سانتریفوژ شد. بر روی ۵۰میلی لیتراز محلول رویی حاصل از سانتریفوژ هرمحیط کشت ، ضمن بهم زدن ملایم، به تدریج سولفات آمونیوم (به غلظت ۵۶۰گرم درلیتر)اضافه شد تا با توجه به وزن مولکولی A، ۸۰٪ اشباع شدگی حاصل شود و بهم زدن درطول شب در ۴ درجه سانتیگراد ادامه یافت . برای جداکردن رسوب تشکیل شده ، عمل سانتریفوژ به مدت ۲۰دقیقه در دمای۴ درجه سانتیگراد و در ۱۰۰۰۰g انجام شد. بعد از اتمام سانتریفوژ مایع رویی لوله ها دور ریخته شد و رسوب هرلوله در۴میلی لیترآب مقطرحل گردید محلولهای حاصل بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در یک لیتر آب دوبارتقطیر (باتعویض سه بارآب مقطر)دیالیز گردیدند.محلولهای دیالیزشده به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در ۴۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. در نهایت محلول رویی لوله ها که حاوی SA بود درآزمایش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید مورد استفاده قرارگرفت .

برای مشخص کردن این مسئله که درکدام محیط کشت SA بیشتری تولید شده است ، روی چهار محیط کشت تغلیظ شده ، مارکرSA و نمونهٔ لیز شدهٔ باکتری توسط هموژنیزردر۱/۵میلی لیتربافرفسفات نمکی(دارای فسفات سدیم mM ۲۰ با pH = ۷/۲ و کلرید سدیمM ۰/۱۵)(۸) آزمایش الکتروفورز با ژل زیرین ۱۰٪و ژل بالائی ۵٪ به روش Laemmli انجام شد(۱۴).بافرنمونه دارای۸/۸ میلی لیترمخلوط A و۱/۲میلی لیتر۲-مرکاپتواتانول بود(مخلوط Aشامل:۷میلی لیتر تریس-اسیدکلریدریکM ۱/۵ باpH=۶/۸، ۱۶/۸میلی لیتر گلیسرول ،۲/۶ گرم SDS ، ۰/۰۰۲گرم برموفنل آبی و۳ میلی لیترآب مقطربود). هر نمونه به نسبت ۱:۱ و مارکر SA (۵mg/ml) به نسبت ۵:۱ با بافرنمونه درلوله‌های پلاستیکی دردار[۱۵]رقیق، و لوله‌ها به مدت۲ دقیقه درحمام آبی۱۰۰ درجه‌سانتیگراد قرار داده شدند. از هر نمونه۲۰ میکرولیتر وازمارکر SA ۲۰ میکرولیتر داخل چاهکها تزریق شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ۲۰۰ولت حدود ۳ ساعت طول کشید. در نهایت ژل به ترتیب: دو ساعت در محلول تثبیت کننده حاوی اسیداستیک ۴۵/۵٪ و متانل۹/۲٪،دوساعت درمحلول رنگ آمیزی دارای آبی کماسی ۰/۰۲۵٪، ایزوپروپانل۲۵٪ و اسیداستیک۱۰٪ قرارداده شد.بعدجهت شفاف شدن زمینهٔ ژل و نمایان شدن باندها ژل درمحلول رنگبرحاوی اسیداستیک ۱۰٪و متانل ۱۰٪ گذاشته شد. برای اثبات وجودSA،آزمایش اختصاصی ایمونوبلوتینگ انجام شد (۹، ۱۴). برای این منظور ابتدا آزمایش الکتروفورز به طریقی که ذکرشد، انجام گردید.بعد از رسیدن رنگ نشانه به حدود نیم سانتیمتری انتهای ژل، پروتئین‌های تفکیک شدهٔ روی ژل با اعمال شدت جریان ۱۰۰میلی آمپربه غشاء نیتروسلولز منتقل شدند. غشاءنیتروسلولز از ژل جدا شد و مراحل زیر به ترتیب انجام گردید: ۱-کاغذ نیترو سلولز داخل پتری دیش حاوی آلبومین ۱٪ (w/v) به مدت یک ساعت روی همزن قرار گرفت. ۲-کاغذ نیتروسلولز سه بار و هربار به مدت۱۰دقیقه با محلول ۰/۰۵٪ PBS -TWEEN۲۰ (دارای بافرفسفات سدیم ۲۰mM با pH=۷/۲ وکلریدسدیم(M ۰/۱۵) شستشو داده شد.۳- کاغذنیتروس لولز داخل پتری دیش حاوی IgG بیوتینه با منشأ موشی با غلظت ۰/۰۰۲ mg/ml قرارداده شد و پتری دیش به مدت یک ساعت روی همزن گذاشته شد. ۴- مرحله ۲ تکرارگردید.۵-غشاء نیتروسلولز داخل پتری دیش حاوی IgG+IgM با منشا خرگوشی کونژوگه شده با پراکسیداز(آنتی IgG موشی) با غلظت ۰/۰۰۱ mg/ml قرارداده شد و پتری دیش به مدت یک ساعت روی همزن گذاشته شد. ۶- کاغذنیتروسلولز با PBS[۱۶] شسته شد و سپس داخل پتری دیش حاوی محلول رنگ آمیزی ۲۵PBS میلی لیتر،آب اکسیژنه ۱۰میکرولیتر ودی آمینوبنزیدین ۴میلی گرم) به مدت ۱۵دقیقه داخل حمام آبی ۳۷ گذاشته شد.۷ - درنهایت کاغذ نیتروسلولز با آب مقطر شسته شد تا ذرات اضافی رنگ ازکاغذ حذف شده و فقط باندهای پروتئین باقی بماند .

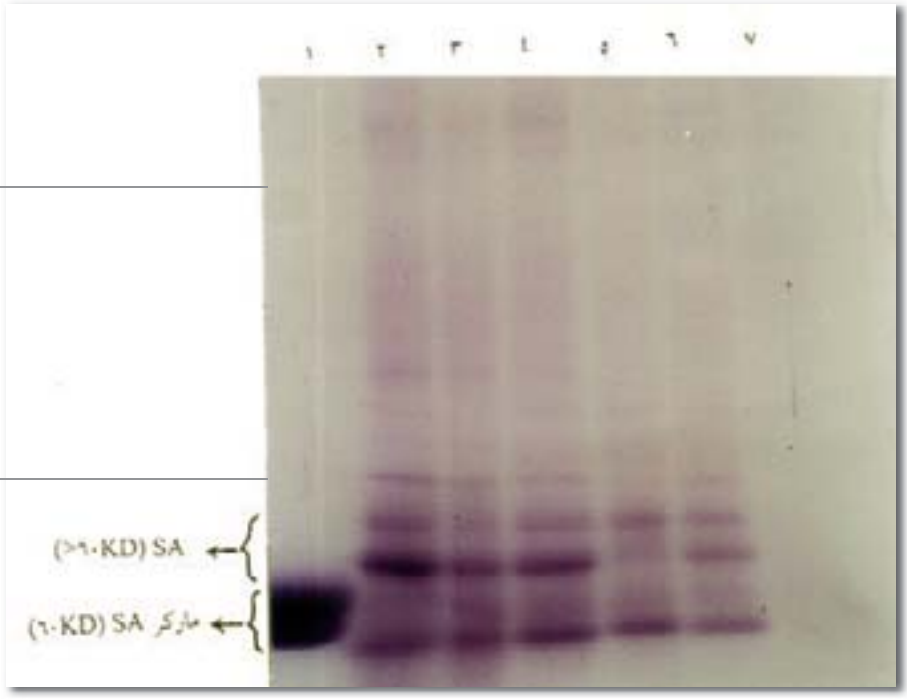
تخلیص نسبی SA

برای تخلیص ، باکتری در محیط LB به میزان ۱۰ لیترکشت داده شد . تخلیص نسبی بوسیلهٔ کروماتوگرافی تعویض یونی و با استفاده ازرزین DEAE – سلولز ،که یک تعویض کنندهٔ یون منفی است ، انجام شد. فعال سازی رزین با استفاده ازاسیدکلریدریک ۰/۵نرمال وسود۰/۵نرمال صورت گرفت و ستونی به ابعاد ۵۵×۲ سانتیمتر آماده گردید. بافرهای مورد استفاده شامل بافر اولیه تریس- اسید کلریدریک ۰/۰۵ نرمال با pH=۷/۳ و بافر اولیه در کلرید سدیم ۷ نرمال بود .۷۰ میلی لیتر از محیط کشت LB حاوی SA از ستون عبور داده شد ، این حجم از محیط کشت حاصل تغلیظ یک لیتر محیط کشت LB با سولفات آمونیم ۸۰٪ بود که قبلاً بوسیلهٔ صافی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلاء صاف گردیده ویک شب در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در مقابل بافر تریس – اسید کلریدریک دیالیز شده بود. در هر لولهٔ شماره‌گذاری شده حدود ۳ میلی لیتر ازخروجی ستون جمع آوری ،و جذب هرنمونه در ۲۸۰ نانومترقرائت گردید (۳).برای اطمینان ازخارج شدن تمامی SA موجود درنمونه پس ازاینکه حدود ۱۵۰میلی لیتر بافر اولیه ازستون عبورکرد،ارتباط بین ظرف بافراولیه و محلول کلریدسدیم ۷ نرمال در بافر اولیه برقرارشد تا بتدریج قدرت یونی بافر افزایش پیدا کند. از اولین لحظهٔ اجرای این مرحله دوباره خروجی ستون درلوله های آزمایش شماره گذاری شده جمع آوری گردید و دوباره جذب هرلوله در ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید (۲، ۴) . کروماتوگرام نمونه‌های جمع‌آوری شده در مقابل جذبهای خوانده شده رسم گردید. کروماتوگرام شامل دو پیک بود. برای مشخص شدن اینکه SA در کدام نمونه‌ها خارج شده است ، آزمایش الکتروفورز(باژل زیرین ۱۰٪ وژل بالائی ۵٪) روی تعدادی از نمونه‌های هرپیک که جذبهای بالایی داشتند به همراه مارکر SA انجام شد و برای اثبات وجود SA در نمونه‌های جمع‌آوری شده آزمایش ایمونوبلوتینگ انجام گردید .

نتایج

بررسی ژل حاصل از الکتروفورز چهار محیط کشت تغلیظ شده نشان داد که در محیط کشت LB نسبت به سه محیط دیگر SA بیشتری تولید شده است ولی درنمونه لیزشده باکتری باندی مشاهده نگردید(شکل ۱). آزمایش ایمونوبلوتینگ روی محیطهای کشت حاوی باکتری وجود SA را تأئید کرد ، ولی در نمونهٔ لیز شدهٔ باکتری باندی دیده نشد (شکل ۲).

کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی وجود دو پیک را نشان داد (شکل۳) .ژل حاصل از الکتروفورز تعدادی از نمونه های خارج شده در هر دو پیک(شکل ۴)، مشخص کرد که قسمت اعظم وخالص SA در پیک اول خارج شده و در نمونه های حاصل ازپیک دوم میزان SA خارج شده جزئی و همراه با ناخالصی(حدود۵۸میلی گرم درلیترکه باتوجه



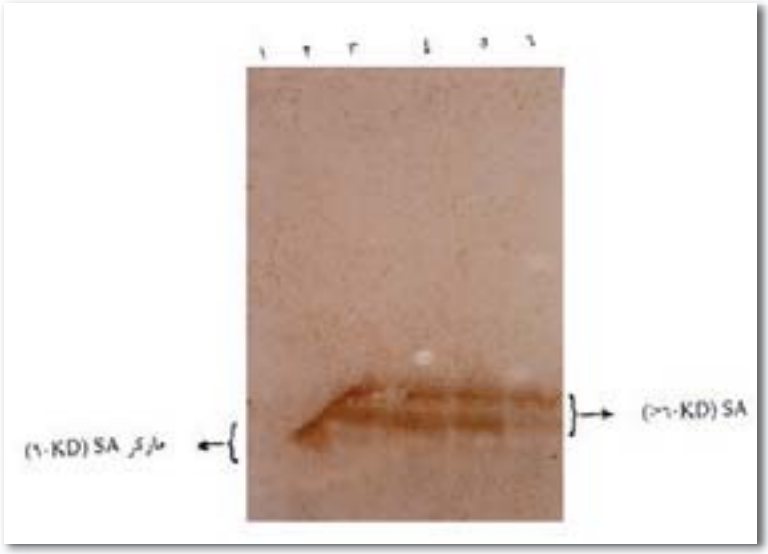
شکل ۱- ژل حاصل ازالکتروفورز روی محیط های کشت حاوی باکتری تغلیظ شده .به ترتیب ازچپ به راست :مارکرSA(باوزن ملکولی ۶۰۰۰۰دالتون)، محیـط های کشت LB، LB+Asn،LB(تکراری)،A،Bونمونه لیـزشده باکتـری (فاقد باند پروتئینی است).ضخامت باند SA درنمونه های LB بیشتراز سایر محیط های کشت است

به جزئی و ناخالص بودن SA درپیک دوم ازآن صرف نظر گردید)بوده است و آزمایش ایمونوبلوتینگ روی تـعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری شـده از هر دو پیک ، وجود SA و خالص و یا ناخالص بودن آن را در این نمونه‌ها تأئید کرد (شکل۵) .

با توجه به جذبهای خوانده شده برای ۵۰ لولهٔ جمع آوری شده درپیک اول وباتوجـه به خلوص SA درایـن نمونه ها،با اسـتفاده از رابطهٔA =Ecl (جـذب نمونه‌هـا= A، ضریب جذب =E ،غلظت = c ،ضخامت سـل = l) و ضـریب جذبSA (۳/۴ =$E_{1\%}$ ۰/۰۱)میـزان SA خالص شـده در این روش حدود ۱۳ میلیگرم درلیترمحیط کشت LB بود.

بحث و نتیجه گیری

از چهار محیط کشـت استفاده شده دراین تحقیق ،دو محیط A وB مصنوعی بوده و جزو محیـط های معین می باشند که این محیط ها حـاوی مخلوطی از مواد غذایی غیرآلی شـامل عناصر اصلی مثل ازت ، منیزیم و کلسیم و همچنین گلوکز جهت تأمین کربن و انرژی هستند. عملاًعوامل رشـد دیگری مانند عناصر نادر هم به این محیطها اضافه می شـود تا رشـد باکتری میسر شود. دو محیط کشـتLBو LB+آسپاراژین مغذی بوده وجزو محیـط های نامعین می باشـند که مقدار و خصوصیات دقیق مواد دراین محیـطها مشـخص نیسـت . عصارهٔ مخمر و تریپتون موجود در محیط های کشت اخیرمخلـوط پیچیده ای ازترکیبات شیمیایی نامشـخص می باشـند،که تریپتون ،اسید های آمینه و پپتیدهای کوچک را تأمین ، درحالیکه عصارهٔ مخمر (سـلولهای مخمر نیمه هضم شـدهٔ خشـک) نیاز ازت را همـراه با قندهـا و موادغذایی آلـی و غیـرآلـی فراهـم مـی کند(۱، ۱۶).بررسـی ژل حاصل ازآزمایش الکتروفورز روی چهار محیط کشـت مذکور و نمونه لیز شـده باکتری نشـــان داد که میزان SA تولید شده در محیط کشـت LB در مقایسه با سه محیط کشت دیگر بیشتر بوده است.پس رشد باکتری در محیط کشـت LB نسـبت به محیط کشـتهای دیگر بهتر بوده اسـت. در محیط کشت LB + آسـپاراژین، آسـپاراژین به غلظت ۰/۷گرم درصد اسـتفاده شد ،که به نظرمی رسـدغلظت مزبور بعنوان عامل محدود کنندهٔ رشد باکتری عمل کرده است و میزان تولید SA دراین محیط کشت نسـبت به محیط کشـت LB کمتربود. درصورتی که آسـپاراژین با همین غلظت بوسیله Cazin و همکاران (۵) درمحیـط های کشت مصنوعی A و B به عنوان منبع تأمین کنندهٔ ازت اسـتفاده شده ودررشد باکتری و میزان

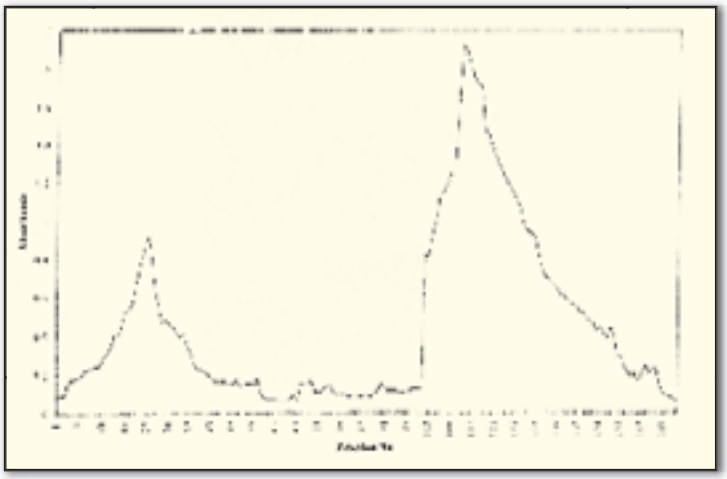


شکل ۲ – آزمایش ایمونوبلوتینگ. به ترتیب از چپ به راست : نمونهٔ لیز شدهٔ باکتری ، مارکر SA و محیط های کشت A،LB+Asn،LBوB

تولید SA تأثیر مطلوبی داشته است.نتایج مطالعات Chaiet و همکاران(۷) نشان می دهدکه SA یک پروتئین مترشحهٔ خارج سلولی است و مشاهده نشدن باند درنمونهٔ لیزشدهٔ باکتری درتحقیق حاضرموید این مسئله است .برای تخلیص نسبی SA از کروماتوگرافی تعویض یونی بارزین DEAE-سلولز استفاده شد ،که یک روش تخلیص غیراختصاصی است. کروماتوگرام حاصل از این آزمایش وجود دو پیک را نشان داد . قسمت اعظم SA(۱۳میلی گرم درلیتر)در پیک اول و مقدارجزئی نیزدرپیک دوم و همراه با ناخالصی (۵۸میلی گرم درلیتر) خارج شد.پس این پروتئین به صورت ایزوفرم بوده که درقدرتهای یونی متفاوت بافرخارج می شود و این مسئله با گزارشات Hofmann و همکاران (۱۳) مطابقت دارد.به طورکلی در این روش غیراختصاصی میزان SA خالص شده حدود۱۳میلی گرم درلیترمحیط کشتLB بودکه این میزان در مقایسه با گزارشات Hofmann و همکاران که با روش اختصاصی کروماتوگرافی میل ترکیبی از چهار لیتر محیط کشت ۱۰ تا ۱۵ میلیگرم SA خالص کرده اند ، مقدار مطلوبی می باشد.

نتایج آزمایشهای الکتروفورز و ایمونوبلوتینگ روی نمونه های SA تخلیص شده نشان داد که SA خالص شده و نیز مارکر SA به صورت دو باندی دیده می شوند که این امر مویدگزارشات Bayer و همکاران (۳) است و به این صورت توجیه شده است که پس از ترشح SA در محیط کشت دو واقعه ملکولی رخ می دهد : زیر واحد سالم ۱۸۰۰۰ دالتونی در اثر هضم پروتئولیتیک به زیر واحد ۱۴۰۰۰ دالتونی تبدیل،و نیز تترامر طبیعی به صورت اشکال الیگومری مجتمع می شود.

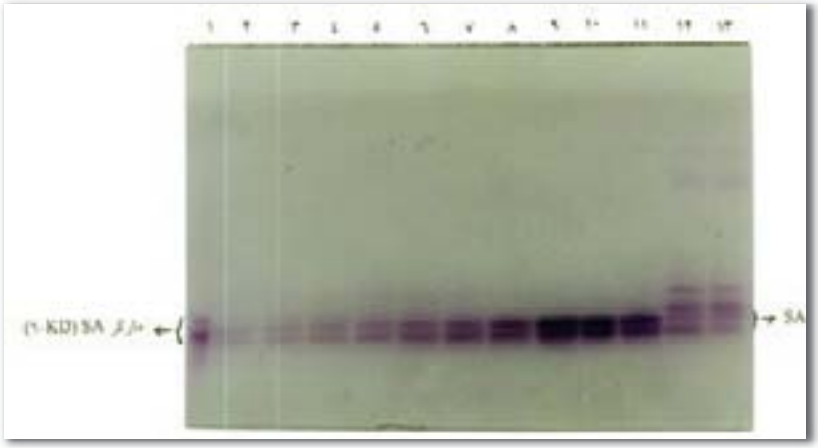
مشاهدهٔحرکت متفاوت مارکرSA درمقایسه باSA تخلیص شده درآزمایشات الکتروفورزانجام شده به این دلیل است که معمولاً SA طبیعی (با وزن ملکولی ۶۶ تا ۷۵ کیلو دالتون) در اثر هضم پروتئولیتیک در دو انتهای آمینی و کربوکسیلی می تواند به فرمی باوزن کمتر(حدود ۶۰ کیلو دالتون)تبدیل شودکه دربازارمارکرهایSA باوزن ملکولی ۶۰۰۰۰ دالتون تحت عنوان کر[۱۷] SAیا استرپت آویدین بریده شده[۱۸]موجوداست که تمایل SA بریده شده برای اتصال به بیوتین بیشتراز SA طبیعی است . از طرفی SA علاوه بر *S.avidini* در تعداد دیگری از اکتینومیستها و نیز اوومیستها دیده شده است. لذا روش تخلیص ، فاصله زمانی بین برداشت کشت و تخلیص و نیز منبع استفاده شده برای تولید مارکر ، عواملی هستند که بر وزن ملکولی مارکر موثر می باشند و این حرکت متفاوت روی ژل با نتایج تحقیقات Diamandis و همکاران همخوانی دارد(۱۰) .اشکال ۴و۵ نتیجه آزمایشاتی بوده که درآنها بین عمل کشت باکتری و آزمایشات تغلیظ وتخلیص به علت دیررسیدن تعدادی از مواد لازم فاصله افتاد.لذا در این اشکال SA تخلیص شده برخلاف اشکال ۱و۲، با مارکر۶۰۰۰۰ دالتونیSA دریک سطح قرارگرفته اند که ناشی ازهضم پروتئولیتیک SA نمونه ها درهمین فاصلهٔزمانی بوده است.درخاتمه باتوجه به کارآئی پروتئین SAدرمقایسه باپروتئین مشابهش آویدین(۱)استفاده ازمحیط های کشت دیگر، مطالعات ژنتیکی درمورد بیان ژن SA ،بررسی کاربردهای این پروتئین وکونژوگه های آن،و نیز استفاده ازروشهای اختصاصی تخلیص همچون کروماتوگرافی میل ترکیبی توصیه می شود تا با بدست آوردن شرایط تولید خالص تر و بیشتر این پروتئین بتوان آن را درمقیاس صنعتی تولید نمود که می تواند گامی درجهت بی نیازی وحتی ارزآوری برای کشور باشد .



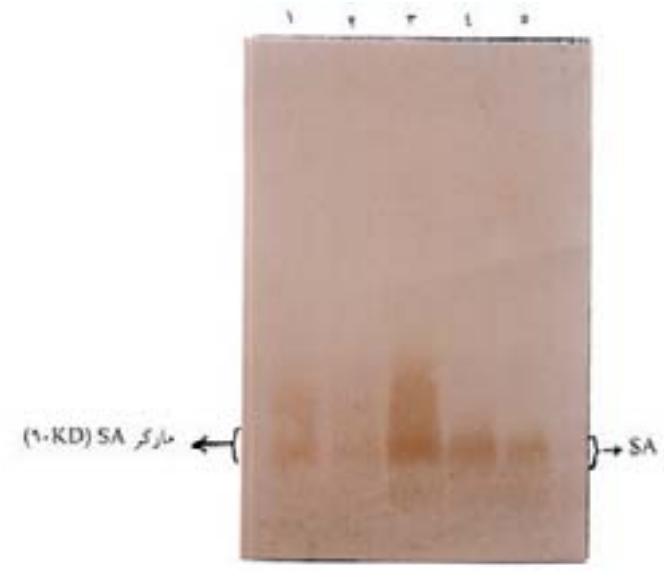
شکل۳ – کروماتوگرام تعداد نمونه های جمع آوری شده علیه جذبه های خوانده شده در۲۸۰ نانومتر درکروماتوگرافی تعویض یونی . SA خالص شده درپیک اول حدود ۱۳میلی گرم درلیتر وکل پروتئین خارج شده درپیک دوم (SA جزئی به همراه پروتئینهای دیگر) حدود ۵۸ میلی گرم درلیتر بود

سپاسگزاری

از آقایان دکتر رضا حیدری ، دکتر مجید صادقی زاده ، دکتر بیژن رنجبر،خانم زرندی وآقای میرلطیف غیبی به خاطر همکاریهای صمیمانهٔشان تشکر و قدردانی می‌شود.



شکل ۴ – ژل حاصل از الکتروفورز روی تعدادی از نمونه های جمع آوری شده از کروماتوگرافی تعویض یونی . به ترتیب از چپ به راست : مارکر SA ، نمونه های جمع آوری شدهٔ شمارهٔ ۷ ، ۹ ، ۱۰ ، ۱۳ ، ۱۹ ، ۲۱ ، ۲۳ ، ۲۵ ، ۲۶ ، ۲۸ ، ۱۱۳ و ۱۱۵ .



شکل ۵ – آزمایش ایمونوبلوتینگ روی تعدادی از نمونه های جمع آوری شده از کروماتوگرافی تعویض یونی . به ترتیب از چپ به راست : مارکر SA ،
نمونه های جمع آوری شدهٔ شمارهٔ ۲۳ ، ۲۵ ، ۱۱۳ و ۱۱۵ .

پاورقی ها

1-Streptavidin
2-Broth
3-Synergistic
4-Affinity Chromatography
5-Localization
6-Affinity Cytochemistry
7-Blotting Technology
8-Gene Probes
9-Conjugated
10-American Type Culture Collection
11-Diethylaminoethyl
12-Immunoblotting
13-Luria Bertani
14-Sodium Dodecyl Sulfate
15-Ependorf
16-Phosphate Buffer Saline
17-Core
18-Truncated

منابع مورد استفاده

۱ - جامعی، رشید.۱۳۷۸. تخلیص SA ازباکتری *S.avidini* .پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی ، دانشکدهٔ علوم پایه ، دانشگاه تربیت مدرس .

۲ -یزدان پرست ،راضیه .۱۳۷۱. راهنمای آزمایشگاه بیوشیمی ،نشرندا،ص ۳۷– ۴۴.

3-Bayer, E.A.and Benhur, H.,1990,Isolation and properties of SA.Methods in Enzymology. 184:80-88.

4-Boyer,R.,2000,Modern experimental biochemistry.published by Hope College,Sanfrancisco,pp:74-79.

5-Cazin, J.and Suter, M.,1988,Production of SA in a synthetic medium.Journal of Immunological Methods.113:75-81.

6-Chaiet,L. and Miller,T.W.,1963,Antibiotic MSD-235.II. separation and purification of synergistic components. Antimicrob. Agents Chemother. 3:28-32.

7-Chaiet,L.and Wolf,F.J.,1964,The properties of SA, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. Arch.Biochem.Biophys.106:1-5.

8-Chart,H.,1994,Methods in practical laboratory bacteriology.CRC Press,Florida,pp:35-45.

9-Creighton,T.E.,1997,Protein structure:A practical approach.IRL Press,Oxford,pp:79-85.

10-Diamandis,E.P.and Christopoulos,T.K.,1991,The biotin-(SA)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clinical Chemistry.37: 625-636.

11-Green, N.M., 1975, Avidin. Advances in protein chemistry. 29: 85-133.

12-Hayes, P. and Wolf, C., 1989, Blotting techniques for the study of DNA, RNA and proteins. Bed. Jr.M. 299:965-968.

13-Hofmann, K. and Wood, S.W., 1980, Immunobiotin affinity columns and their application to retrieval of SA. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4666-4668.

14-Laemmli,U.K., 1970,The discontinous SDS-PAGE system.Nature. 227:680.

15-Leboffe,M. and Pierce,B.,1995,Atlas for the microbiology laboratory.Morton Company,Colorado, pp:91-93.

16-Nester,E.W.and Roberts,C.E.,1983,Microbiology.published by Saunders College,Japan,pp:277-278.

17-Stapley, E.O. and Mata, J.M., 1963, Antibiotic MSD-235. I.Production by S.avidini and S. Lavendulae. Antimicrob.Agents Chemother. 3:20-27.

18-Suter,M.and Cazin, J.,1988, Isolation and characterization of highly purified SA obtained in a two- step purification procedure from S.avidini grown in a synthetic medium.J.Immunol.Methods. 113: 83-91.

19-Wilchek, M.and Bayer, E.A.,1988,The avidin-biotin complex in bioanalytical applications.Analytical Biochemistry. 171: 1-32.