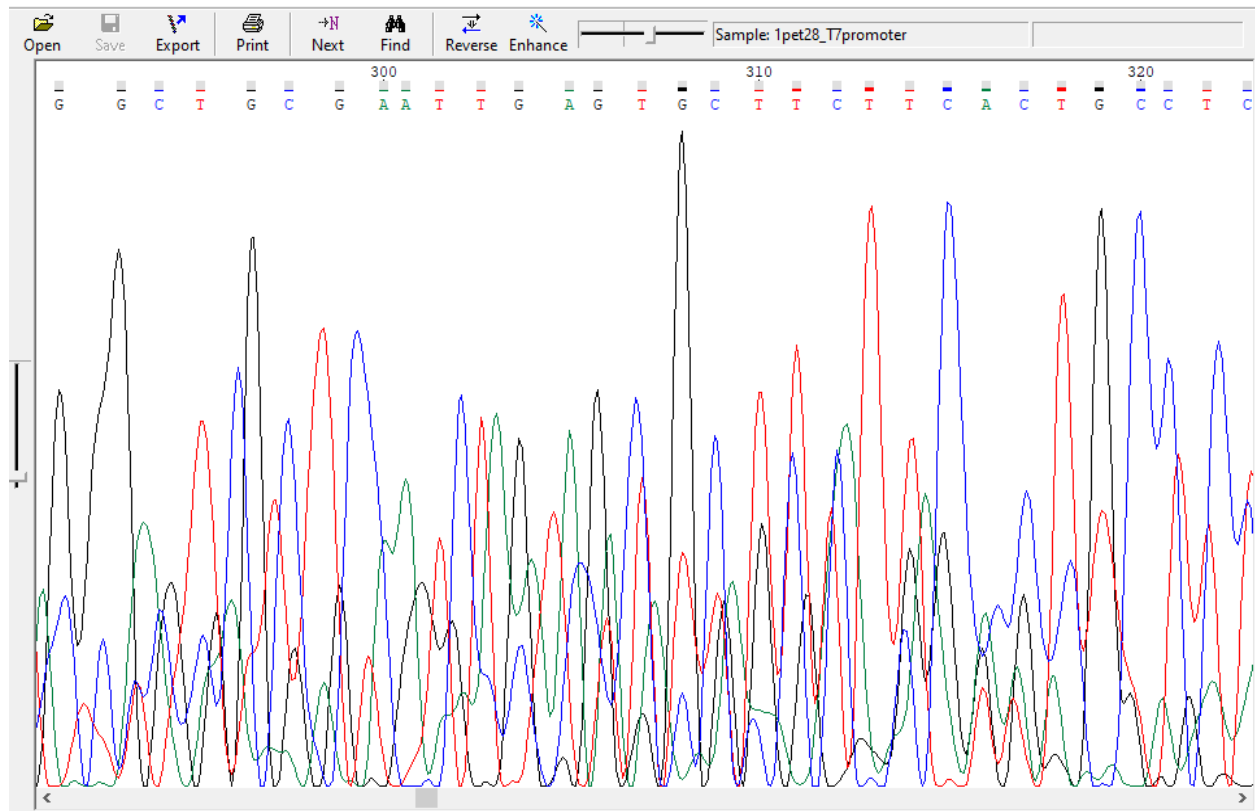


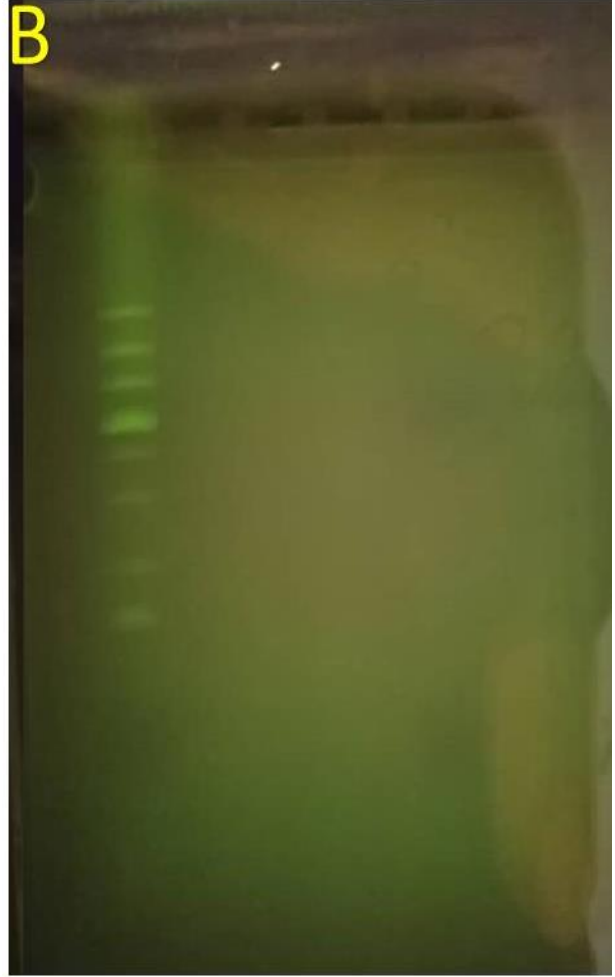
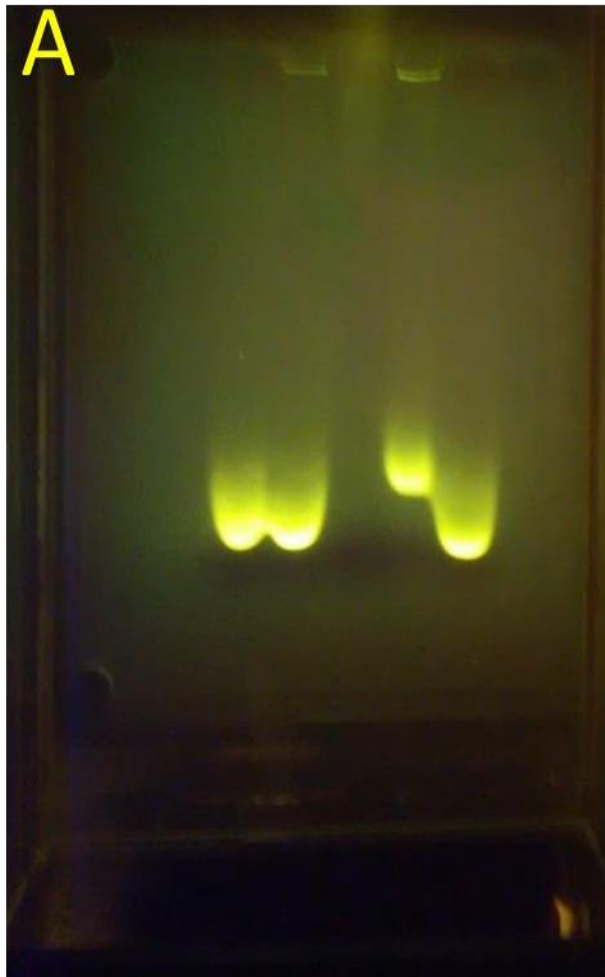
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

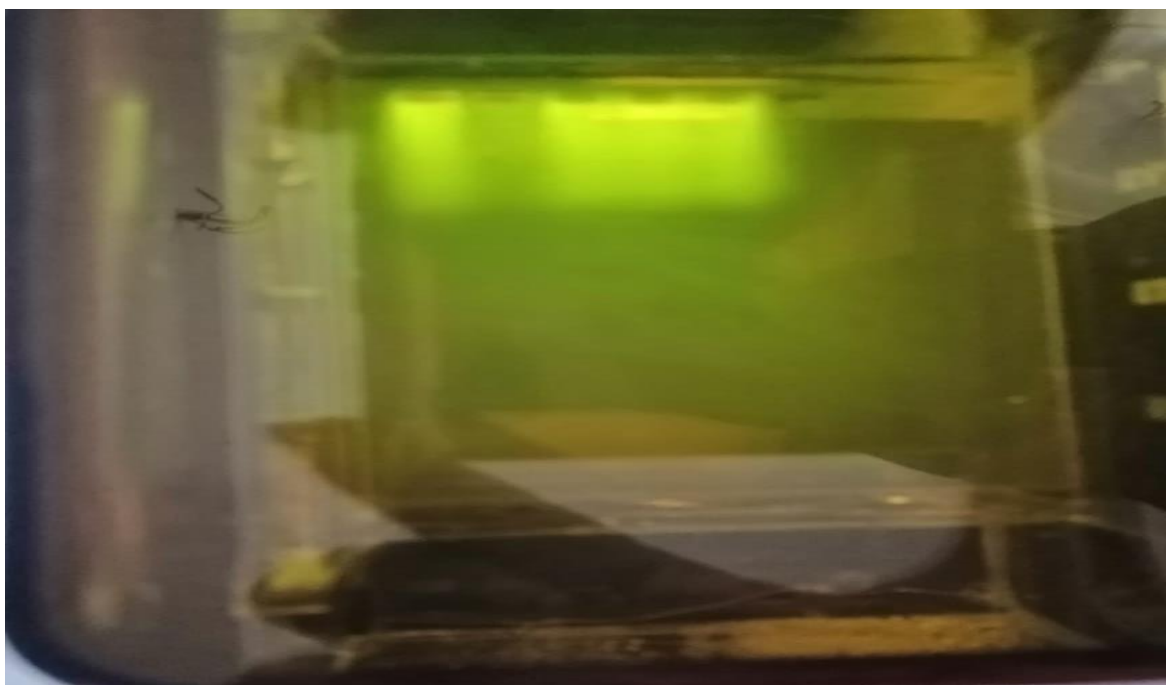
گزارش عملکرد طرح تریپسین تا تاریخ ۱۱ مرداد

SEQUENCING



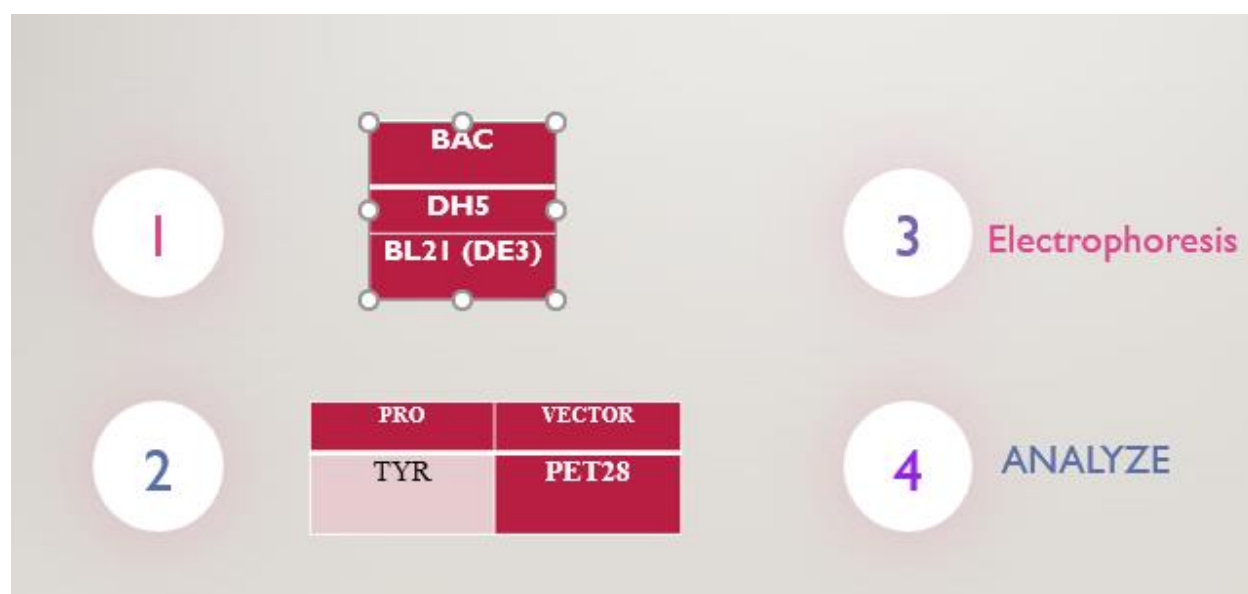
استخراج پلازمید





مقدار	موارد مورد استفاده	
0.44 gr	Agarose	۱
Up to 25 ml	TAE buffer 1x	۲

مراحل:



انتقال پلازمید به باکتری

به منظور انتقال وکتور حاوی ژن تریپسین به باکتری BL21 از سه روش زیر استفاده گردید:

۱- روش پیشنهاد شده توسط مرکز DNA Learning Center

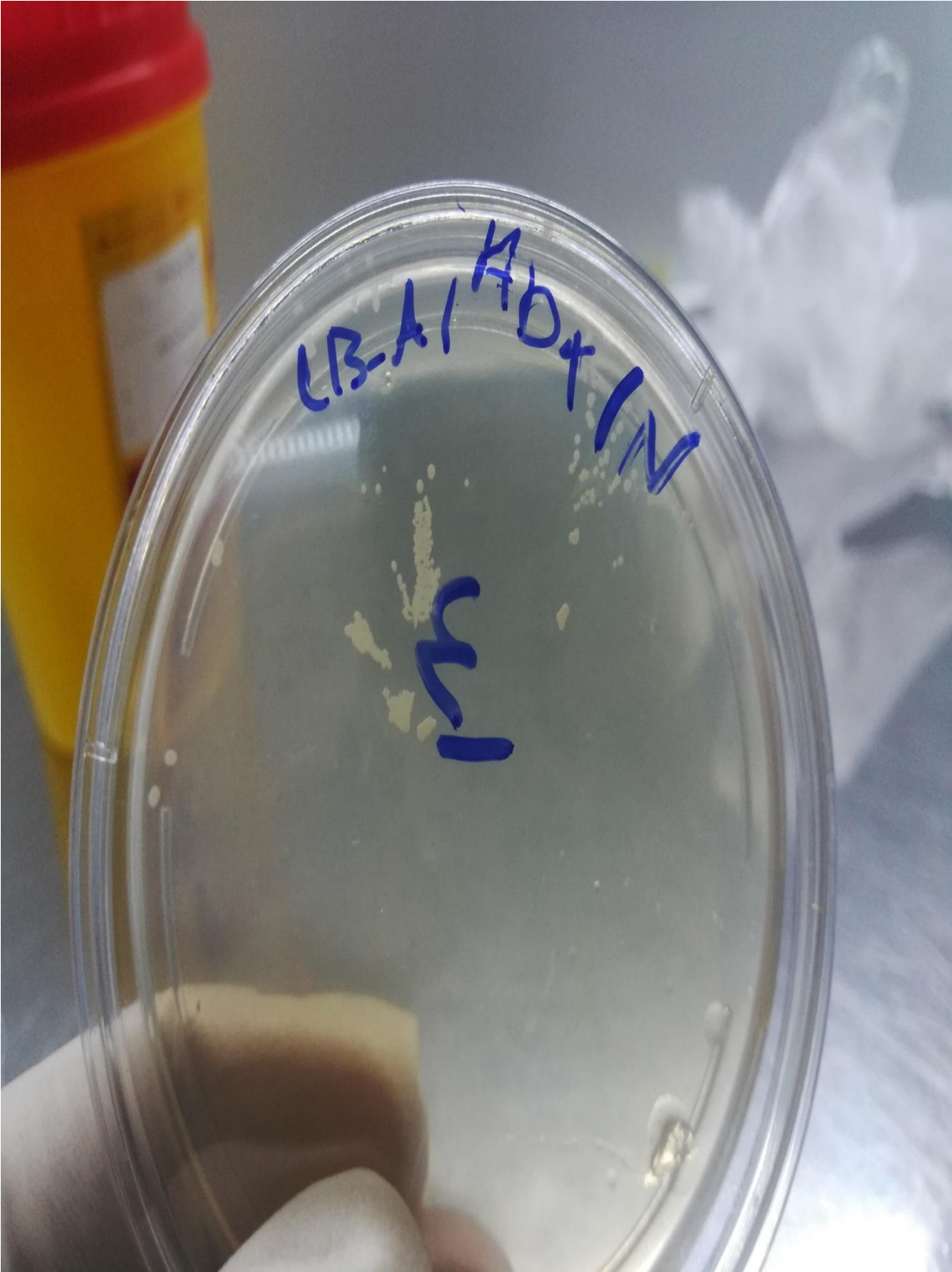
۲- روش ارائه شده توسط مجری طرح

۳- روش پیشنهاد شده در برخی مقالات

وکتور حاوی ژن پلازمید دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین می باشد. پس از مسیر انتقال پلازمید باکتری ها به منظور غربالگری و حذف باکتری هایی که فاقد پلازمید بودند به محیط کشت باکتری LB مایع و LB-Agar حاوی آنتی بیوتیک اضافه شده و باکتری هایی که رشد نموده بودند، به منظور ادامه مسیر ذخیره گردید.



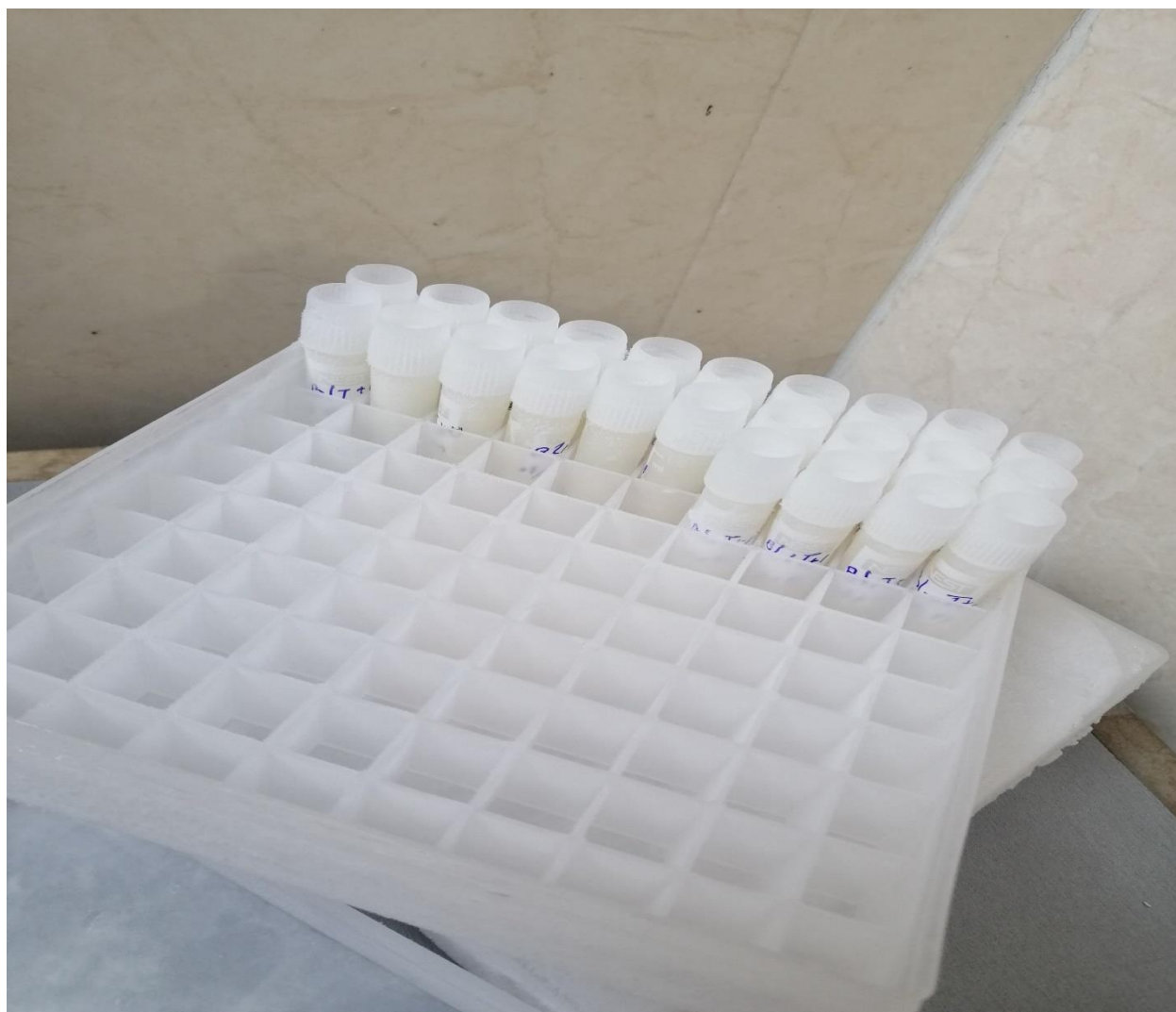






ذخیره باکتری حاوی پلازمید تریپسین

از باکتری هایی که طی مرحله قبل غربالگری شده بود استوک هایی (گلیسرول + باکتری) برداشته شد و در دمای ۷۰- ذخیره گردید.





کشت باکتری

به منظور کشت باکتری از محیط LB استفاده گردید.

شرایط کشت باکتری:

کشت باکتری در محیط lb طی دو مرحله شبانه و روزانه، تحت شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۸۰ rpm صورت گرفت. پس از کشت روزانه با توجه به حجم باکتری کشت شده به محیط IPTG به عنوان تحریک کننده بیان پروتئین اضافه شد و در دمای انکوباتور متناسب با IPTG و بیان پروتئین در دماهای مختلف قرار گرفت.

پس از پایان کشت، باکتری های رشد یافته در محیط کشت بوسیله سانتریفیوژ از محیط جدا شده و رسوب داده شدند.

لیز باکتری با بافرهای مختلف

به منظور استخراج پروتئین از باکتری ابتدا باید لیز باکتری توسط بافر لیزات مناسب انجام گردد. بافر لیزات باید دارای قدرت نمکی مناسب، توانایی تجزیه مناسب دیواره سلولی، pH ایزوالکتریک متناسب با پروتئین مد نظر باشد. بدین منظور سه بافر ریپا، اوره و SDS-NaOH مورد بررسی قرار گرفت.

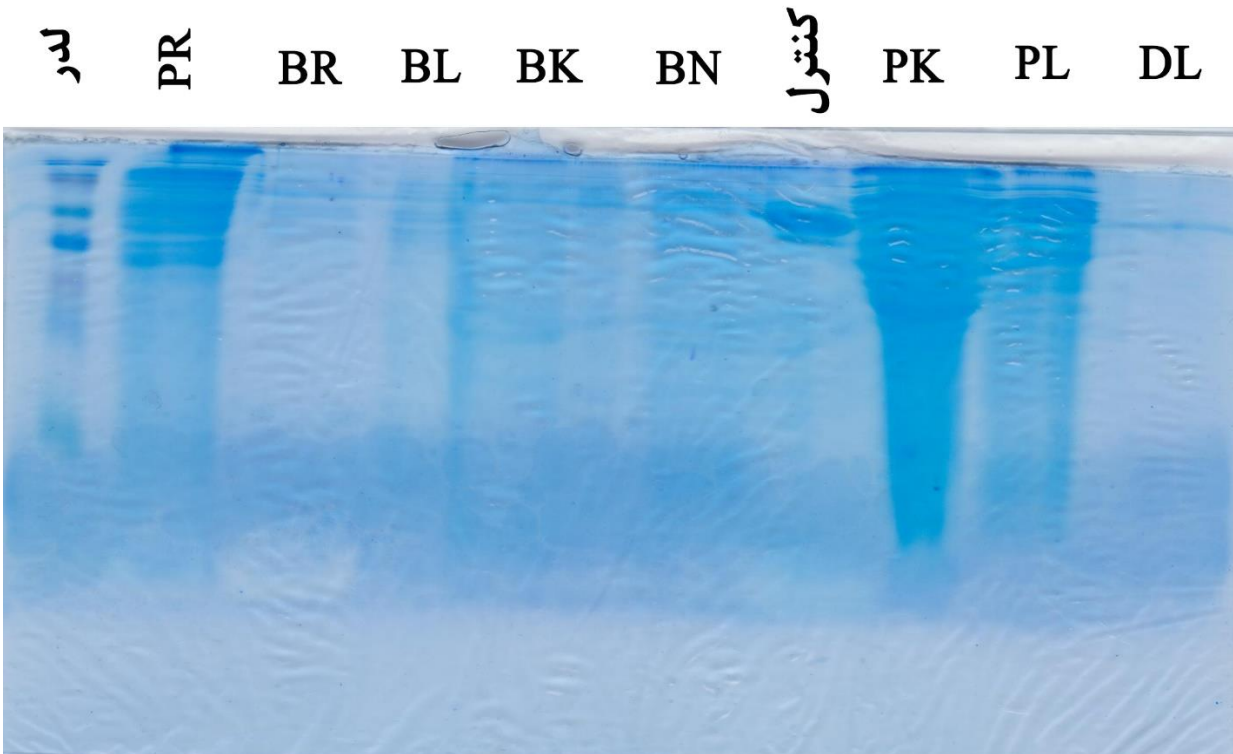
نتیجه الکتروفورز:

سه بافر ریپا، اوره و SDS-NaOH به میزان مشابه و مناسبی لیز سلول را انجام می دهند.

انتخاب بافر:

با توجه به میزان لیز مناسب، تناسب pH بافر با pI آنزیم تریپسین ($pI=10.5$) و حضور میزان بالای اوره که موجب به هم ریختن ساختار تریپسین و کاهش فعالیت آن می شود، بافر اوره به عنوان بافر لیزکننده انتخاب شد.

لیز انواع باکتری های موجود با بافرهای لیز مختلف:



بررسی بافرهای لیزات

۲۸ خرداد ۱۴۰۱

رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو

الکتروفورز SDS-PAGE

روش تهیه ژل

مقدار **TEMED** به ژل فوقانی تهیه شده، اضافه شد و پس از مخلوط کردن، بلافاصله روی ژل تحتانی ریخته شد و سریعاً شانه داخل ژل قرار گرفت.

مقدار **TEMED** مورد نیاز برای ژل تحتانی به مخلوط بقیه مواد ژل تحتانی اضافه شد و کاملاً مخلوط شد و سپس داخل قالب شیشه‌ای تا ارتفاعی که حدود ۳ سانتی‌متر فضا برای ژل فوقانی باقی بماند ریخته شد.

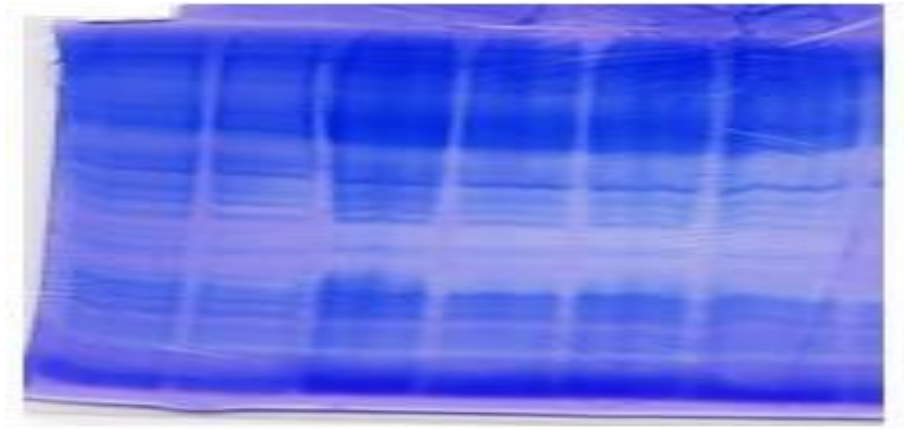
مقدار ۱ میلی‌لیتر از مخلوط ژل تحتانی به طور جداگانه با **TEMED** مورد نیاز برای مقدار ژل مورد نظر، مخلوط و به فضای بین شیشه‌ها ریخته شد. (به خاطر بالا بودن مقدار **TEMED**، این مقدار ژل سریع می‌پنسد و بنابراین در فاصله بین انتهای شیشه‌ها ژل قرار گرفته و از نشست ژل تحتانی جلوگیری می‌شود).

صفحات شیشه‌ای، شانه و پلاستیک انتهای صفحات با آب و الکل ۹۰٪ کاملاً تمیز شد و با گیره محکم شد و قالب شیشه‌ای به طور عمودی روی سطح صاف قرار گرفت.

روش آماده‌سازی نمونه

$$OD \times 100 \times 0.4 = \text{loading}$$

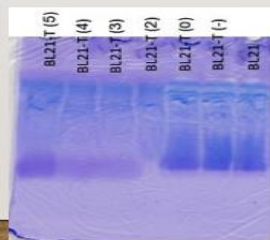
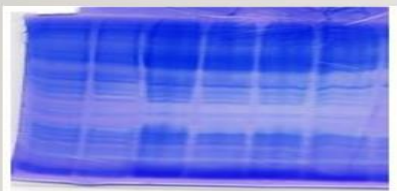
$$OD \times 100 - \text{loading} = \text{water}$$



Figures

سرم
خون

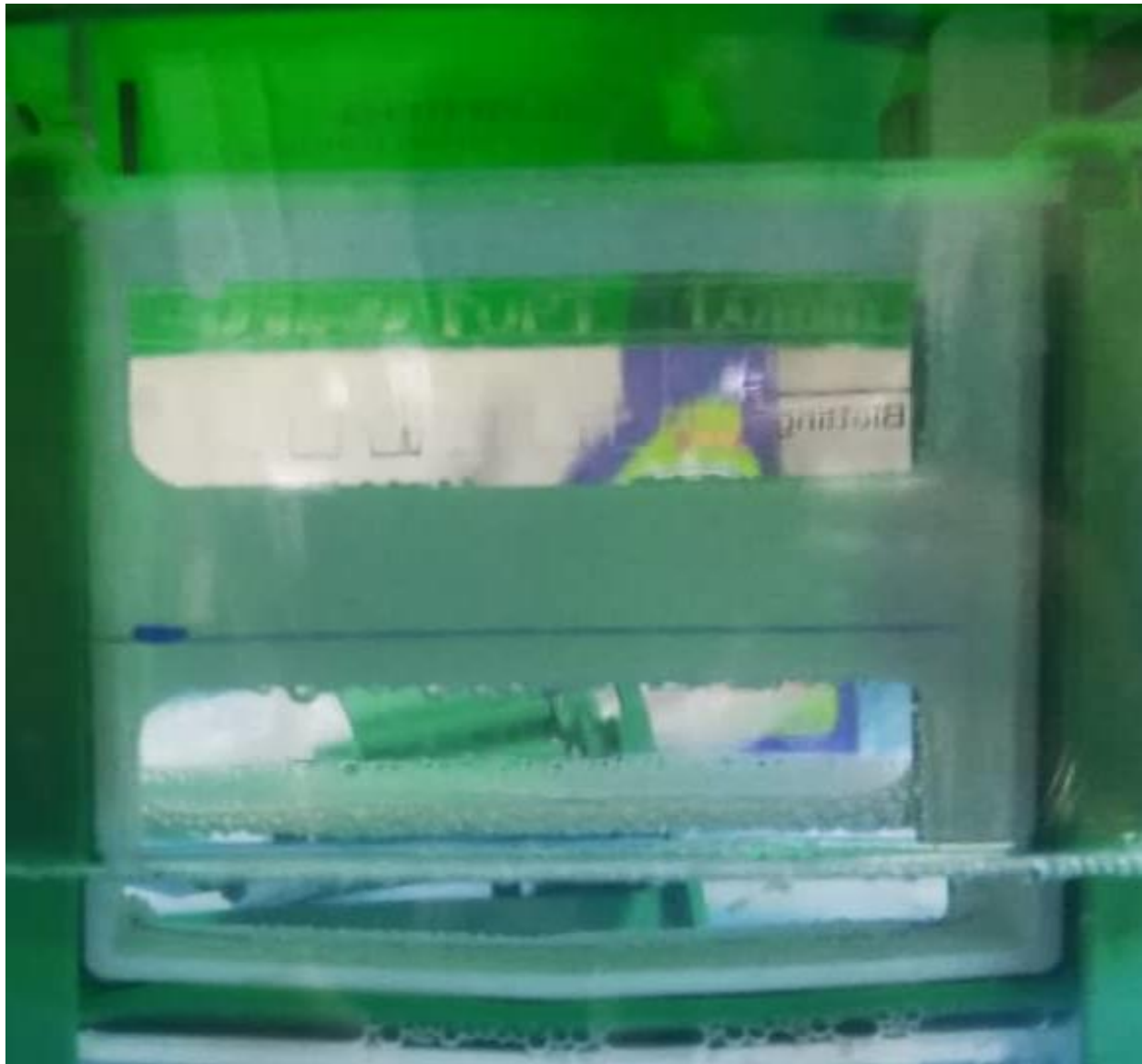
- picture.

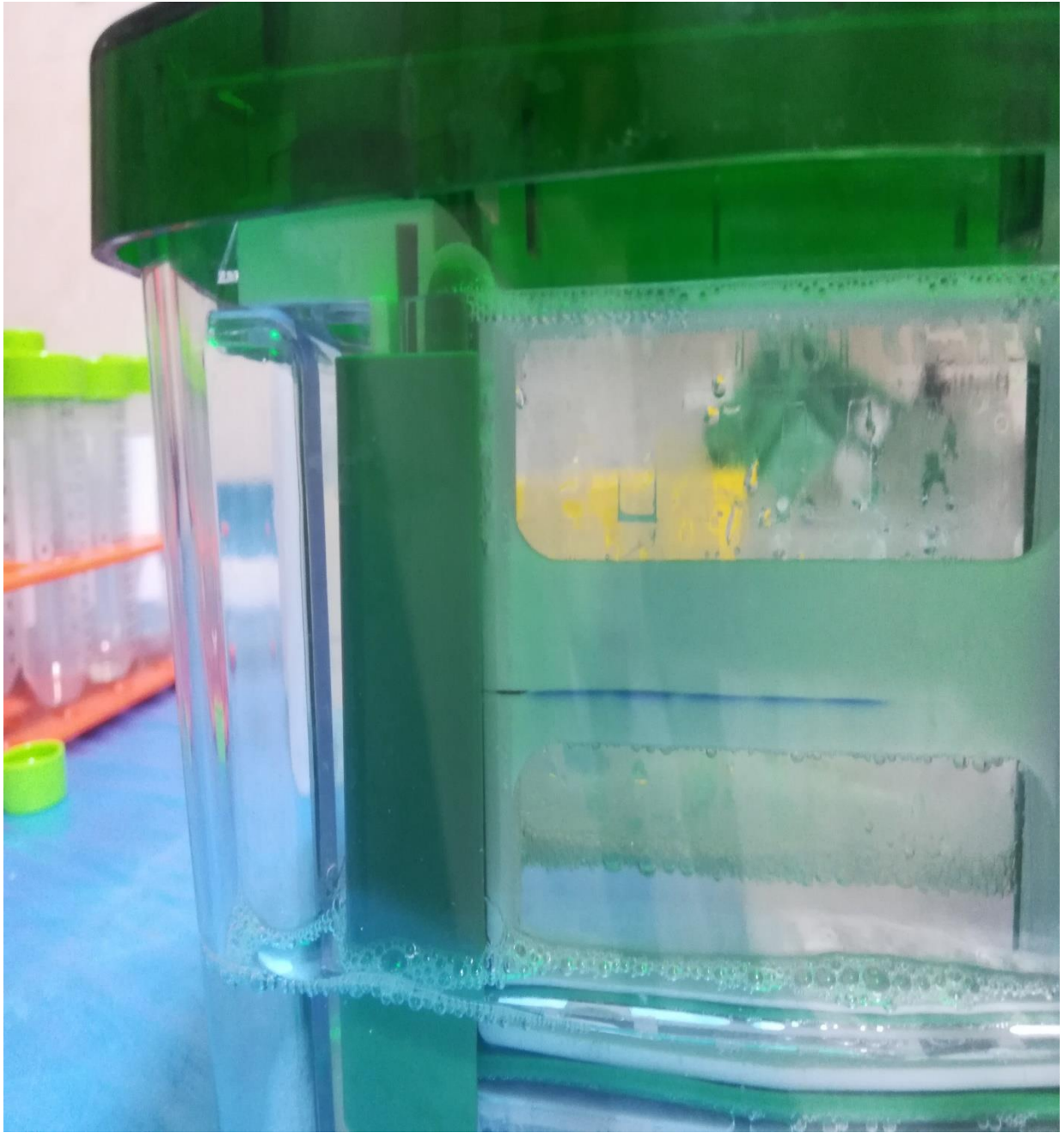


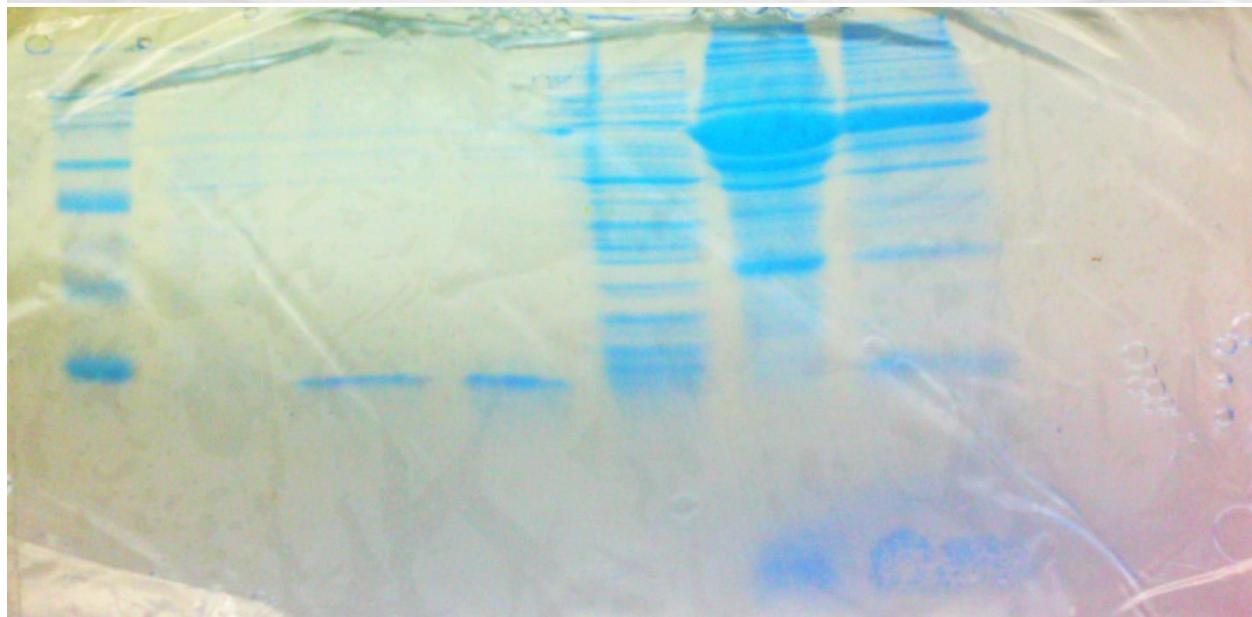
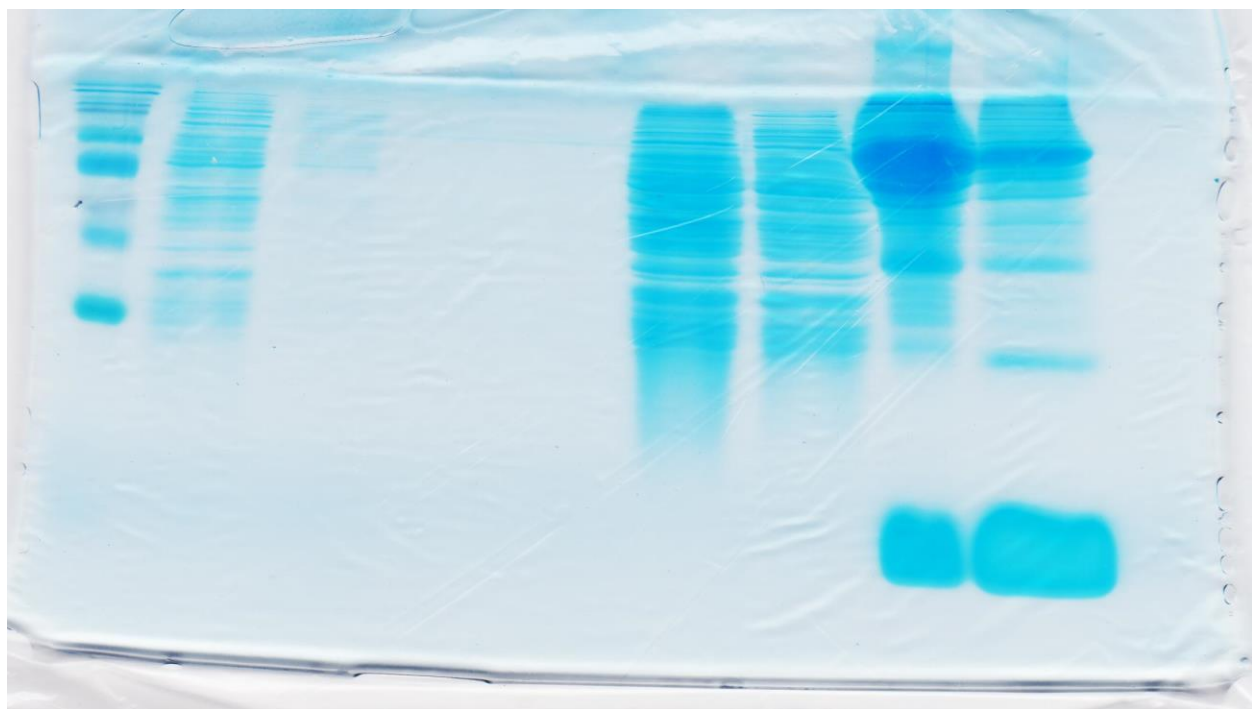
تغییر سیستم الکتروفورز:

به منظور افزایش کیفیت الکتروفورز SDS-PAGE تغییراتی از قبیل زیر انجام شد:

- ۱- تمامی بافرها مجدد تنظیم و ساخته شد.
- ۲- تنظیمات مربوط به سیستم الکتروفورز مجدد تنظیم گردید.
- ۳- نمونه های کنترل جدید در کنار نمونه های مورد بررسی قرار داده شد.

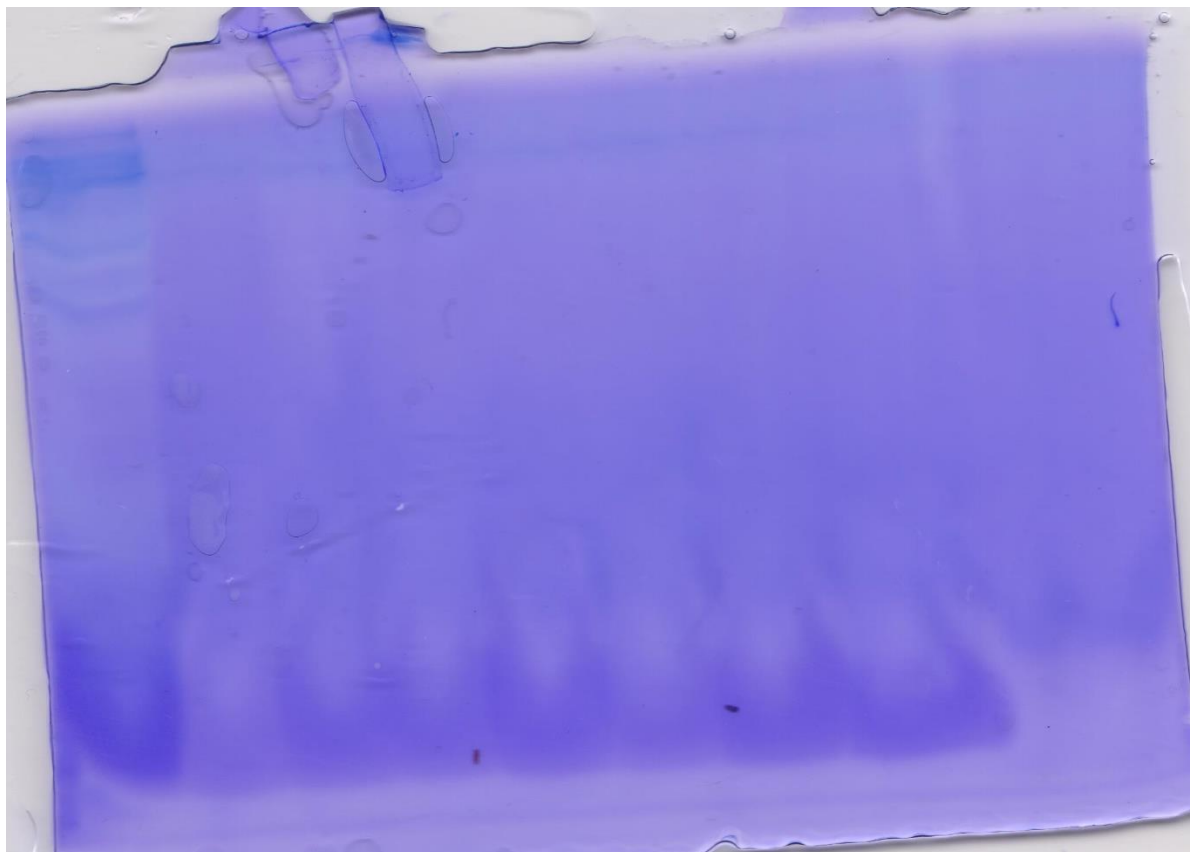


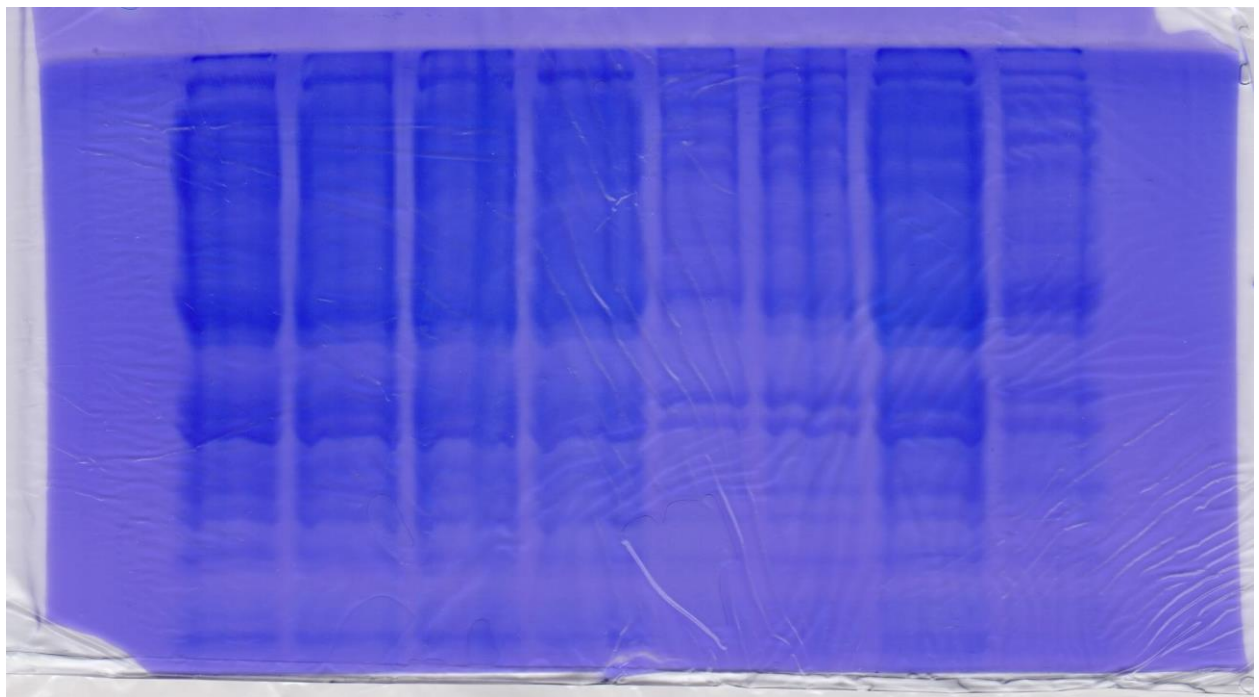
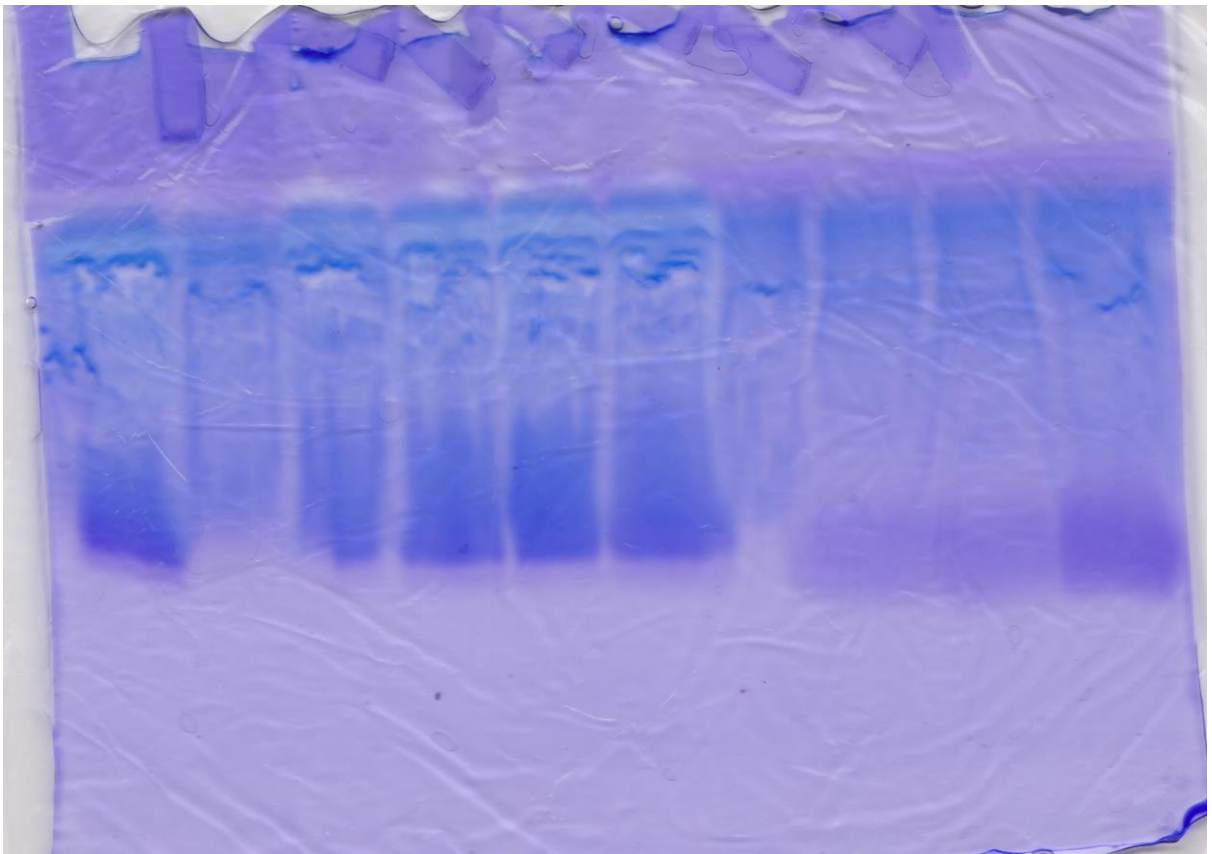




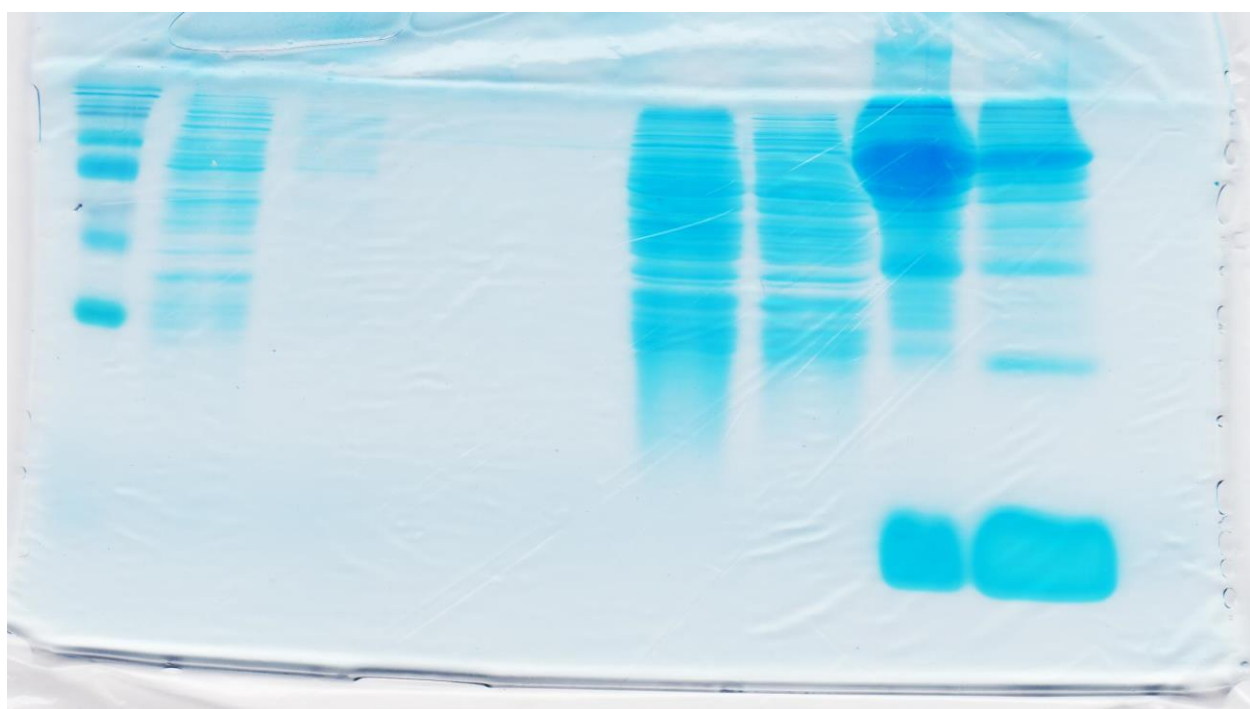
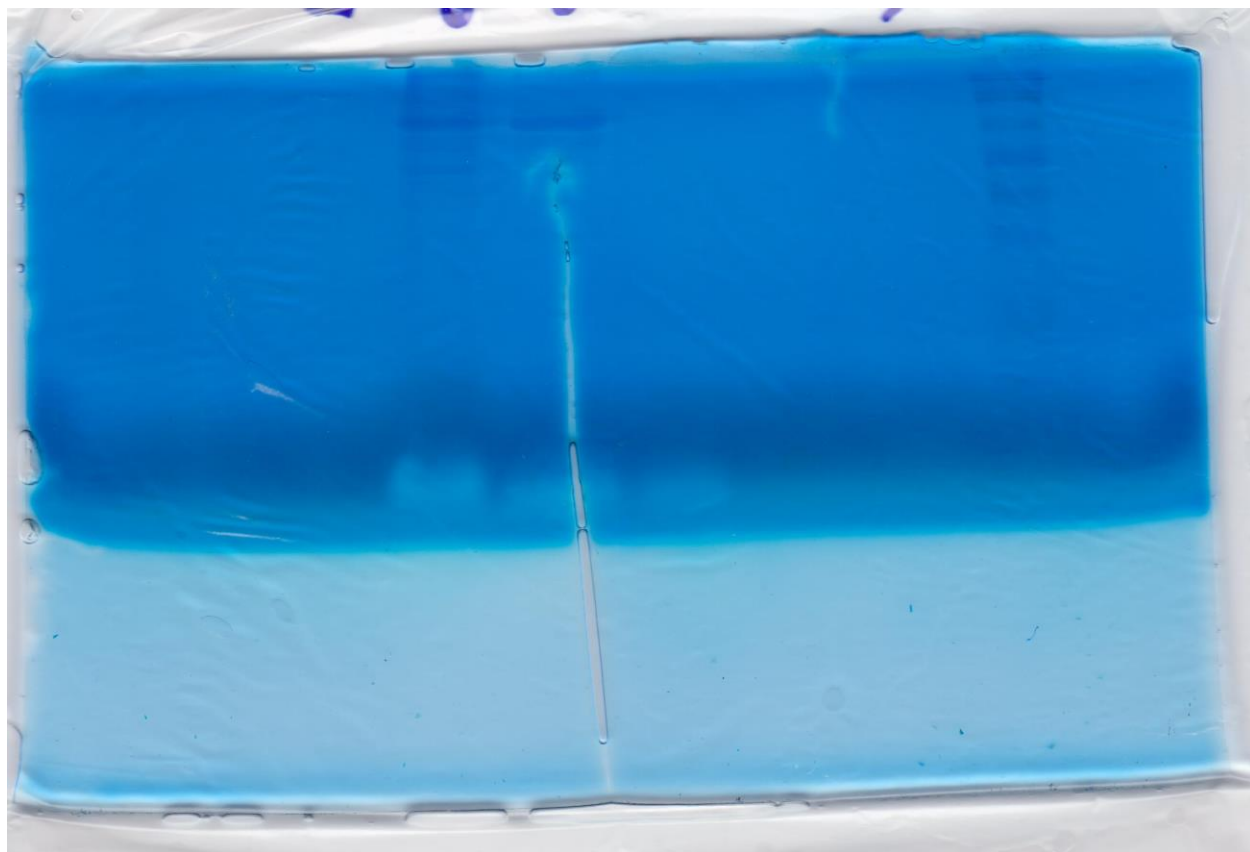
رنگ آمیزی ژل و بررسی باندها

روش رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو R-250



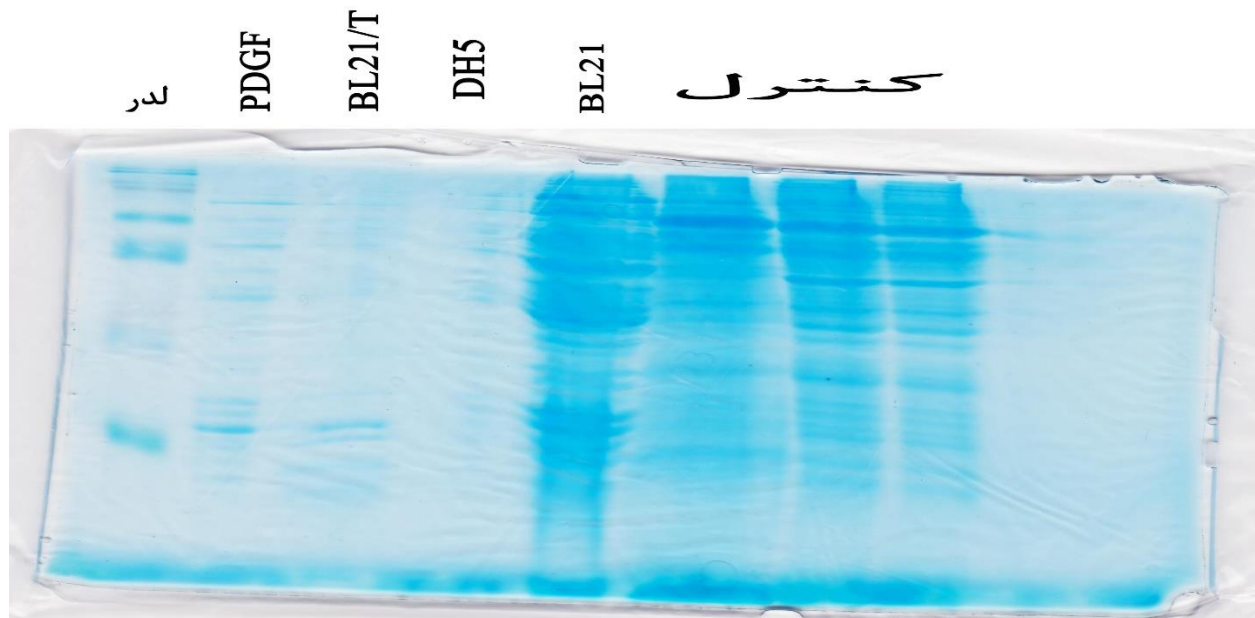


روش رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو G-250

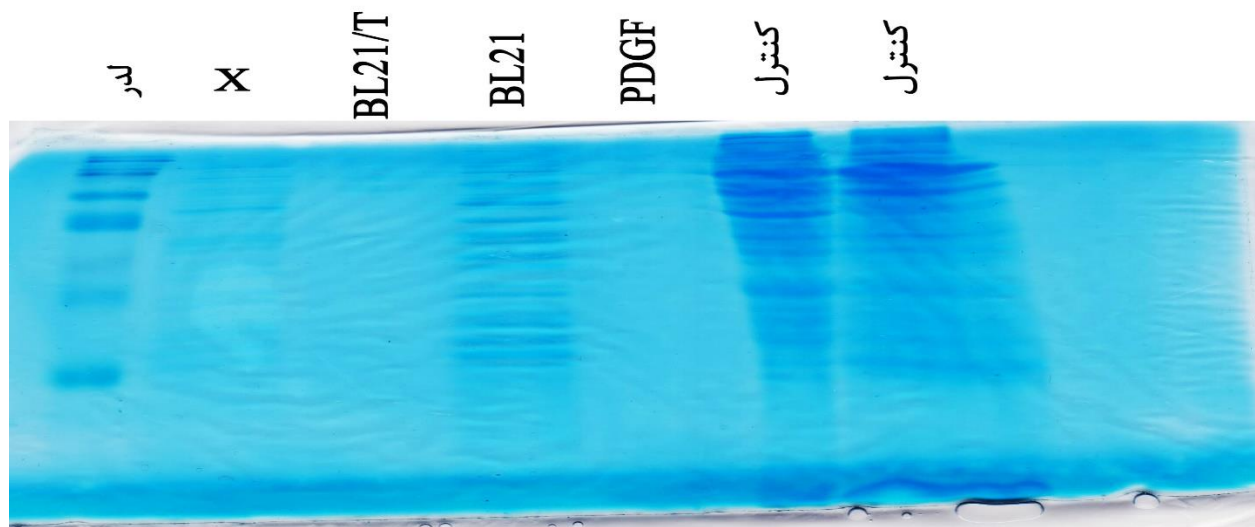


انجام الکتروفورز و تحلیل نتایج

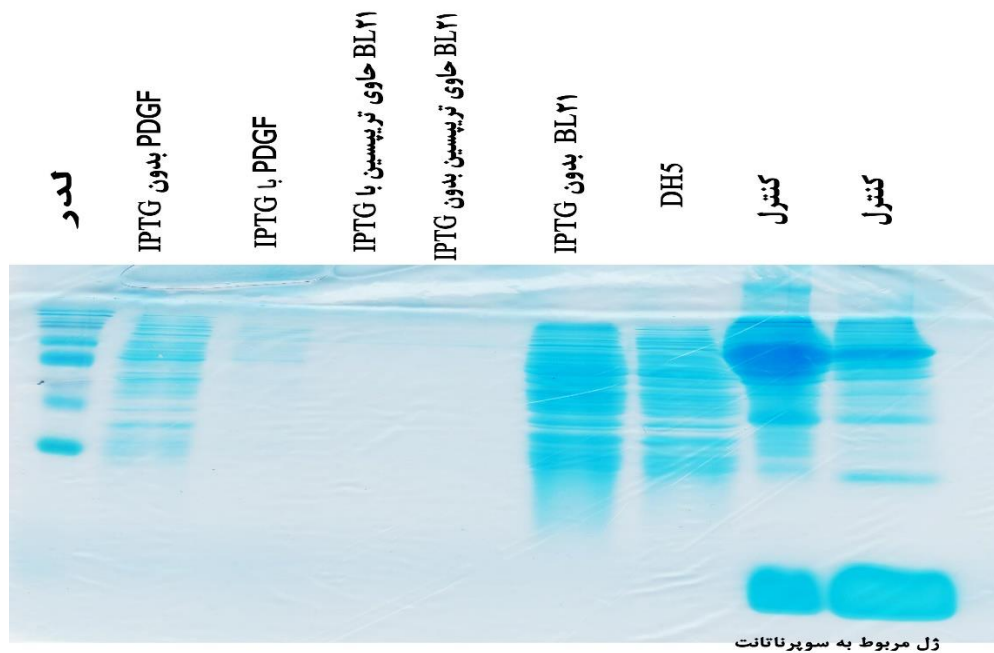
بررسی میزان بیان آنزیم تریپسین



ژل مربوط به سوپرناتانت
۳۱ خرداد ۱۴۰۱
رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو



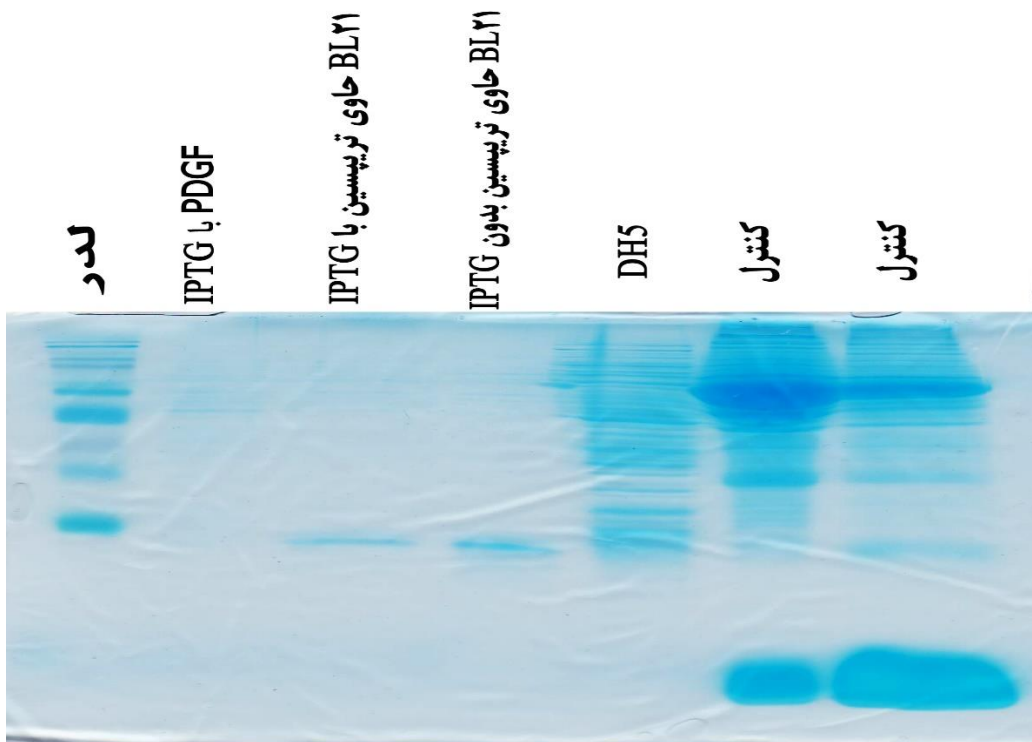
ژل مربوط به رسوب
۳۱ خرداد ۱۴۰۱
رنگ آمیزی کوماسی



ژل مربوط به سوپرناتانت

۵ تیر ۱۴۰۱

رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو



ژل مربوط به رسوب

۵ تیر ۱۴۰۱

رنگ آمیزی کوماسی برلینت بلو

نتایج حاصل از آنالیز ژل های الکتروفورز SDS-PAGE:

پس ژل های الکتروفورز مشاهده شد که پروتئوم باکتری BL21 که فاقد پلازمید تریپسین است کاملاً سالم و بر روی ژل قابل مشاهده است. پروتئوم مربوط به باکتری BL21 حاوی پلازمید تریپسین دیده نمی شد و یا به مقدار بسیار زیادی تحلیل رفته بود.

از مشاهدات فوق می توان نتیجه ای مبنی بر بیان حضور آنزیم تریپسین فعال و تجزیه پروتئوم سلول توسط این آنزیم را برداشت نمود. بر روی ژل های مربوط به الکتروفورز باند مشخصی در ناحیه مربوط به پروتئین تریپسین مشاهده نشد که فرضیه خودتخریبی آنزیم تریپسین را بسیار قوی نمود.

تخلیص تریپسین بوسیله ستون نیکل-آگاروز

این بخش از پژوهش که به منظور تایید نهایی تولید تریپسین طراحی شده است شامل چند مرحله می باشد. مراحل عبارتند از:

۱- کشت باکتری، تحریک باکتری توسط IPTG و در نهایت جمع آوری رسوب باکتری به منظور بررسی در سطح پروتئین.

۲- لیز باکتری به وسیله بافر لیزات مناسب و دستگاه سونیکاتور

۳- جداسازی پروتئین از سایر ترکیبات سلولی بوسیله سانتریفیوژ

۴- جداسازی پروتئین تریپسین از سایر پروتئین ها با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل

۵- بررسی و تایید حضور تریپسین در قسمت تخلیص شده با استفاده از روش برادفورد و الکتروفورز

علل طرح و انجام آزمایش فوق عبارتند از:

۱- آنزیم تریپسین از خانواده آنزیم های پروتئاز می باشد که پپتید و پروتئین ها را در سمت کربوکسیل اسیدآمینو های آرژنین و لیزین برش می زند.

۲- این آنزیم تاثیری بر پیوند پپتیدی بین دو اسیدآمینو هیستیدین ندارد.

۳- در انتهای ژن تریپسین طراحی شده توالی His-Tag وجود دارد که توسط تریپسین برش داده نمی شود.

۴- ستون نیکل آگاروز برای جداسازی پروتئین های حاوی توای His-Tag می باشد و هر پروتئین یا پپتید حاوی این توالی را جدا می کند.

۵- با توجه به موارد فوق اگر بیان پروتئین تریپسین انجام شده باشد پس از استخراج پروتئین بوسیله ستون نیکل-آگاروز، پروتئین تریپسین یا قطعه‌ی حاوی توالی His-Tag توسط این نوع کروماتوگرافی از سایر پروتئین ها جدا می شود که با بررسی توسط الکتروفورز (در صورت بزرگ بودن قطعه) و برادفورد بررسی می گردد.

کشت باکتری:

در این مرحله باکتری BL21 حاوی ژن تریپسین به میزان زیاد کشت شد.

علت میزان بالای کشت:

۱- دریافت حداکثری میزان تریپسین موجود در صورت حضور

۲- در صورتی که تریپسین خود تخریبی انجام دهد و فقط قطعه تگ متصل به تعدادی کمی آمینواسید به ستون متصل شود، توسط برادفورد قابل تشخیص باشد.

۳- در صورتی که تریپسین موجب تخریب پروتئوم سلول گردد انتظار می رود که میزان بیان آن به علت تجزیه آنزیم های مورد نیاز برای سنتز این پروتئین، بسیار کمتر شود.

لیز باکتری:

با توجه به بافرلیزاتی که در مرحله‌ی قبل تنظیم گردیده بود و همچنین پروتکل مربوط به ستون نیکل-آگاروز مورد استفاده بافر لیزا جدید تنظیم گردید. این بافر لیزات حاوی آنزیم لیزوزیم و مهارکننده‌ی PMSF به عنوان مهارکننده‌ی سرین پروتئازها می باشد.

❖ بافر برای استخراج پروتئین در حالت نیچر (طبیعی) پروتئین تنظیم گردیده است.

پس از لیز باکتری بوسیله بافر لیزات به منظور تخریب DNA موجود در لیزات به آن آنزیم Dnase I اضافه شده و پس از اطمینان از تخریب DNA، لیزات در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد.

❖ سونیکاتور موجب تخریب کامل دیواره سلولی و DNA باقی مانده می شود تا از لیز کامل و تخریب DNA اطمینان حاصل گردد.

جداسازی پروتئینها از سایر اجزا سلولی:

از سانتریفیوژ در دور ۱۴۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه برای جداسازی پروتئوم از سایر اجزا سلولی استفاده گردید و بخش مایع رویی که حاوی پروتئینها می باشد برای استخراج پروتئین توسط ستون مورد استفاده گردید.

❖ به منظور اطمینان از عدم رسوب پروتئین، قسمت رسوب نیز نگه داشته شد و توسط الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین بوسیله ستون نیکل آگاروز:

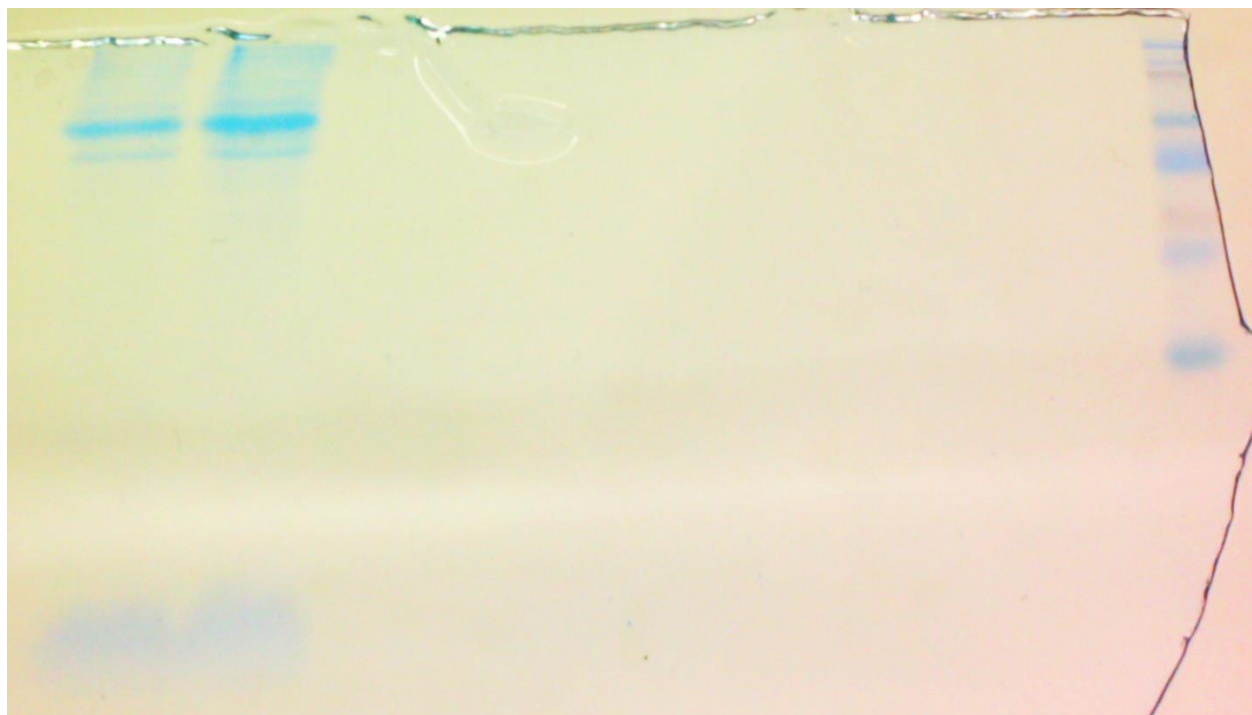
تخلیص پروتئین توسط ستون نیکل آگاروز شرکت و طبق دستورالعمل داده شده توسط این شرکت انجام گردید.

نتایج بدست آمده

ژل مربوط به پروتئین استخراج شده حاوی باند آنزیم تریپسین نبود.

نتایج مربوط به برادفورد نشان دهنده حضور پروتئین می باشد.

دو نتیجه فوق را می توان بدین صورت تفسیر نمود که پروتئین تریپسین بیان شده پس از بیان شروع به تجزیه پروتئم و خود تخریبی نموده است. در انتهای آنزیم تریپسین تگ (نشان) اولیگوهایستیدینی متصل شده است که این تگ توسط آنزیم تریپسین برش داده نشده و تجزیه نمی گردد که در بخش پروتئین استخراج شده توسط روش برادفورد دیده شده ولی باتوجه به اندازه کوچک آن در الکتروفورز قابل مشاهده نیست.



برنامه های پیش رو

در ادامه مسیر تلاش برای تخلیص آنزیم تریپسین به صورت کامل و تجزیه نشده انجام خواهد پذیرفت.

برخی از موارد مد نظر برای جلوگیری از خودتخریبی و یا استخراج آنزیم تریپسین عبارتند از:

۱- کاهش دما در زمان اعمال IPTG و همچنین انجام تمامی مراحل پس از آن بر روی یخ:

کاهش دما موجب کاهش فعالیت آنزیمی می گردد. بنابراین با کاهش دمای محیط انکوباتور در زمان اضافه نمودن IPTG به محیط میزان فعالیت آنزیم های تولید شده کاهش می یابد. بعلاوه قرار گرفتن بر روی یخ در ادامه مسیر نیز خود کم کننده ای بر کاهش فعالیت است که امکان تخلیص آنزیم سالم را افزایش می دهد.

۲- محلول سازی مجدد رسوب و عبور آن از ستون برای اطمینان از عدم رسوب آنزیم

بخش مشاهده شده در برادفورد تگ هیستیدین و توالی کوتاهی از اسیدآمینوهای متصل به آن است.

❖ در الکتروفورز رسوب باند شاخصی دیده نشده است اما نمی توان از امکان رسوب آنزیم کامل چشم پوشی نمود، بنابراین پروتئین های موجود در بخش رسوب مجدداً Salt in شده و از ستون عبور داده می شوند تا در صورت حضور آنزیم سالم، تخلیص گردد.

۳- استفاده از سیستم بافری برای حالت دینیچر شده (فرم غیر طبیعی):

با توجه به اینکه در حالت غیرطبیعی فعالیت پروتئین ها کم می گردد امکان تخلیص پروتئین کامل در حالت غیرطبیعی نسبت به حال طبیعی بیشتر می باشد.

۴- استفاده از میزبان های مختلف:

با توجه به احتمال تولید اندک تریپسین پیش از اضافه نمودن IPTG به محیط بنظر می رسد که PET28 در باکتری BL21 دارای اندکی بیان است. بنابراین با بررسی سایر میزبان ها می توان امکان تولید و عملکرد بهتر را بررسی نمود و در صورت بهبود نتایج جایگزینی میزبان را در دستور کار قرار داد.