

برنامه های ذکر شده در جلسه مورخ ۱۱ مرداد ۱۴۰۱ و اقدامات انجام شده در راستای این موارد

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.

در حال حاضر دمای انکوباسیون در ۱۸ درجه سانتی گراد است که نتیجه حاصله مطلوب می باشد.

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 اسیدآمین های 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.

استخراج پروتئین از باکتری ها به دو بخش رسوب و مایع رویی تقسیم می شود:

۱. بخش مایع رویی:

ابتدا توسط ستون نیکل آگاروز تخلیص شده و به دو بخش پروتئین های مازاد و پروتئین های دارای تگ هیستیدین (تریپسین) تقسیم می گردد. بخش تخلیص شده در مرحله بعد دو قسمت تقسیم می شود که بخشی ذخیره شده و پروتئین های موجود در بخش دوم بوسیله استون رسوب داده شده و سپس مجدداً بوسیله TBST محلول می گردند که این عمل موجب تغلیظ میزان پروتئین می شود.

۲. بخش رسوب:

به منظور بررسی حضور اینکلوژن بادی ها، ابتدا پروتئین های موجود رسوب بدست آمده توسط مسیر اوره ۸ مولار و طی مسیر دینیچر نمودن پروتئین ها، واسرشت شده سپس مایع رویی بدست آمده که حاوی این پروتئین ها است مشابه مایع بالایی وارد مسیر تخلیص پروتئین با ستون نیکل آگاروز با سیستم دینیچر می گردد.

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

با توجه به اینکه در حالت غیرطبیعی فعالیت پروتئین‌ها کم می‌گردد امکان تخلیص پروتئین کامل در حالت غیرطبیعی نسبت به حال طبیعی بیشتر می‌باشد.

این مرحله در مسیر قبل گنجانده شده است.

۴- استفاده از میزبان‌های مختلف:

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

میزبان رزتا گامی و اوریگامی با همکاری پژوهشکده این سینا تهیه شد که به علت عدم تناسب آنتی بیوتیک این میزبان‌ها با آنتی بیوتیک غربالی pet28 (هر دو مقاوم به کانامایسین می‌باشند) امکان استفاده از این میزبان‌ها وجود ندارد.

۵- تولید آنزیم به صورت پروآنزیم و غیرفعال

در صورتی که از روش‌های فوق نتیجه مناسب حاصل نشد طراحی مجدد کانستراکت و قرار دادن ژن آنزیم به صورت پروآنزیم و غیرفعال

همزمان با بررسی موارد فوق در جهت نتیجه گیری و تولید تریپسین به صورت فعال، طراحی کانستراکت مربوط به پروآنزیم نیز در مراحل نهایی است.

سایر مراحل و اقدامات انجام شده در راستای طرح و شکست کار

۱. اضافه نمودن محیط کشت TB علاوه بر محیط LB

محیط TB بسیار غنی تر از محیط قبل بوده و برای تولید پروتئین نو ترکیب مناسب تر است بنا براین به منظور افزایش میزان بیان و امکان دریافت میزان بیشتر پروتئین محیط LB علاوه بر محیط محیط TB اضافه گردید.

نتایج بدست آمده حاکی از رشد و زنده مانی بسیار بهتر باکتری‌ها در محیط TB می‌باشد.

۲. تنظیم روش و سترن بلات:

روش و سترن بلات با سیستم WET به منظور بررسی دقیق حضور پروتئین در محیط تنظیم گردید.

بررسی‌ها و نتایج بدست آمده تا تاریخ ۸ آبان ۱۴۰۱

پس از تنظیم و اعمال تغییرات ذکر شده در بالا نتایج حاصله پس از بررسی های مورد نظر به شرح زیر می باشد:

- ۱- میزان رشد و زنده مانی باکتری و همچنین تولید کلی پروتئین در محیط TB حائز اهمیت بود.
- ۲- پس بررسی با وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اولیه anti-His Tag پروتئین تریپسین، باند پروتئین در ناحیه ۴۰ کیلودالتون در هر دو بخش سوپرناتانت و اینکلوژن بادی مشاهده شده و میزان مشاهده شده در هر دو قسمت تقریباً برابر (سوپرناتانت اندکی بیشتر) است.