



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

• رشید جمعی، • منوچهر میرشاهی و • حسین نادری منش،  
گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

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 می باشد. هر کدام از این زیر واحدها با تمایل زیادی می توانند به یک ملکول بیوتین متصل شوند. در پژوهش حاضر شرایط کشت باکتری در محیط های کشت معین (B) و (A) و نامعین (LB و LB + آسپارازین)، 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 طور نسبی خالص گردید. بررسی درجه خلوص پروتئین توسط SDS – PAGE و ایمونوبلوتینگ 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<sup>۱</sup> از سال ۱۹۶۳ آغاز شده است. اولین مطالعات به وسیله Stapley و همکاران (۱۷) با کشت باکتری *Streptomyces avidini* در محیط کشت آگوشت<sup>۲</sup> انجام شد. آنها در بررسی هایشان دریافتند که محصول تولید شده به وسیله این باکتری، قسمتی از ترکیب آنتی بیوتیک توآمان-MSD<sup>۳</sup> ۲۳۵ می باشد که می تواند هم در محیط کشت طبیعی با توان تغذیه ای بالا و هم در محیط کشت مصنوعی با توان تغذیه ای پایین تولید شود.

Chalet و همکاران (۶) در مطالعاتشان دریافتند که آنتی بیوتیک مذکور دارای دو جزء توآمان 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 وسیله باکتریهای گرم منفی است، جزء دیگر این آنتی بیوتیک پروتئین بزرگی با وزن مولکولی حدود ۶۰۰۰ دالتون می باشد و چون جزء اخیر مانند آویدین سفیده تخم مرغ با تمایل شدید به بیوتین خارج سلولی متصل می شود، آن را SA نامیدند.

SA مانند آویدین دارای چهار زیر واحد یکسان بوده که هر زیر واحد آن دارای یک مکان اتصال برای بیوتین میباشد. میل ترکیبی بالای آن بایوتین ( $M^{-1} 10^{15}$ ) 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 (در کروماتوگرافی میل ترکیبی<sup>۴</sup>)، جایابی<sup>۵</sup> (در سیتوشیمی میل ترکیبی<sup>۶</sup> و فناوری بلوتینگ<sup>۷</sup>) و تشخیص (در سنجشهای ایمنی، آسیب شناسی بافتی و پروبهای ژن<sup>۸</sup>) مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۹، ۱۹). با توجه به کاربردهای مذکور و استفاده گسترده این پروتئین و کونژوگه های آن در آزمایشگاههای تشخیص طبی و مراکز تحقیقاتی دنیا و با عنایت به ناشناخته بودن آن در مجامع علمی و مراکز تحقیقاتی داخل، لزوم انجام تحقیقی در مورد آن احساس می شد. لذا در تحقیق حاضر ابتدا با انتخاب چهار محیط کشت مختلف و کشت *S.avidini* در آنها، 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 گسترده تر بر روی این پروتئین باشد.

## مواد و روشها

## مواد

*S.avidini* از ATCC ۲۷۴۱۹<sup>۱</sup> تهیه شد، تریپتون و عصاره مخمر ساخت شرکت DIFCO بود،<sup>۱۱</sup> DEAE سلولوز، IgG بیوتینه بامنشأ موشی، IgG + IgM با منشأ خرگوشی کونژوگه شده با پراکسیداز و مارکر SA (با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰ دالتون) از SIGMA و بقیه مواد مورد

استفاده در تهیه محیطهای کشت، تخلیص، الکتروفورز و ایمونوبلوتینگ<sup>۱۲</sup> از MERCK تهیه شدند.

## کشت باکتری

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

اسیدبوریک ۵۰۰ گرم، سولفات مس آبدار ۴۰ میکروگرم، یدید پتاسیم ۱۰۰ میکروگرم، کلرید آهن آبدار ۲۰۰ میکروگرم، سولفات منگنز آبدار ۴۰۰ میکروگرم، مولیبدات سدیم آبدار ۲۰۰ میکروگرم، سولفات روی آبدار ۴۰۰ میکروگرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ۱ گرم، سولفات منیزیم آبدار ۰/۵ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، و کلرید کلسیم آبدار ۱/۰ گرم. همه این مواد در هاون چینی به خوبی مخلوط شدند. محیط های کشت به صورت زیر تهیه شدند:

الف) محیط کشت مایع مصنوعی A: مخلوط نمکها و عناصر نادر ۱/۷ گرم، L-آسپاراژین ۷ گرم، گلوکز ۱۰ گرم و فسفات هیدروژن پتاسیم (KHPO<sub>4</sub>) ۱ گرم. حجم این مواد با آب دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده شد. pH محلول حاصل بعد از اتوکلاو ۶/۵ بود.

ب) محیط کشت مایع مصنوعی B: مواد موجود در محیط کشت مایع مصنوعی A به اضافه: 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 بعد از اتوکلاو ۶/۱ بود.

ج) محیط کشت LB<sup>۱۳</sup>: تریپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم و کلرید سدیم ۵ گرم. حجم مخلوط به یک لیتر رسانده شد و pH محلول حاصل بعد از 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 اتوکلاو ۷/۳ بود. اتوکلاو محیط های کشت به مدت ۱۵ دقیقه و در فشار ۱۵ lb انجام شد (۵، ۸، ۱۸).

برای کشت از سویه *S.avidini* ۲۷۴۱۹ استفاده شد که همین سویه قبلاً بوسیله Cazin و همکاران (۵) نیز استفاده شده است. محیط های کشت مصنوعی A و B قبلاً برای کشت *S.avidini* به وسیله 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 تهیه محیط کشت پیش کشت به منظور تلقیح در محیطهای کشت، ۰/۴ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری خریداری شده در کنار شعله در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB استریل تلقیح شد. لوله داخل انکوباتور (دما ۳۲°C 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 میلی لیتر از محیطهای کشت مذکور اضافه شد. پس از انجام اتوکلاو در کنار شعله به هر ارلن ۱۷ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری اضافه گردید. ارلنها داخل انکوباتور (دما ۳۲°C و سرعت همزن ۱۵۰ دور در دقیقه) قرار گرفتند. با توجه به گزارش Cazin و همکاران (۵) روز دهم که حداکثر رشد لگاریتمی این باکتری است، ارلنها از انکوباتور خارج گردیدند و به هر ارلن برای توقف رشد باکتری و جلوگیری از آلودگی به غلظت ۰/۱ (۴ گرم) آزید سدیم اضافه شد. سپس محتویات ارلنها بوسیله قیف بوختر با صافی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلاء صاف گردید

IgG موشی) با غلظت  $0.01 \text{ mg/ml}$  قرار داده شد و پتری دیش به مدت یک ساعت روی همزن گذاشته شد. ۶- کاغذنیتروسلولز با  $\text{PBS}^{16}$  شسته شد و سپس داخل پتری دیش حاوی محلول رنگ آمیزی  $\text{PBS}^{25}$  میلی لیتر، آب اکسیژنه  $10$  میکرولیتر و دی آمینوبنزیدين  $4$  میلی گرم) به مدت  $15$  دقیقه داخل حمام آبی  $37$  گذاشته شد. ۷- در نهایت کاغذ نیتروسلولز با آب مقطر شسته شد تا ذرات اضافی رنگ از کاغذ حذف شده و فقط باندهای پروتئین باقی بماند.

### تخلیص نسبی SA

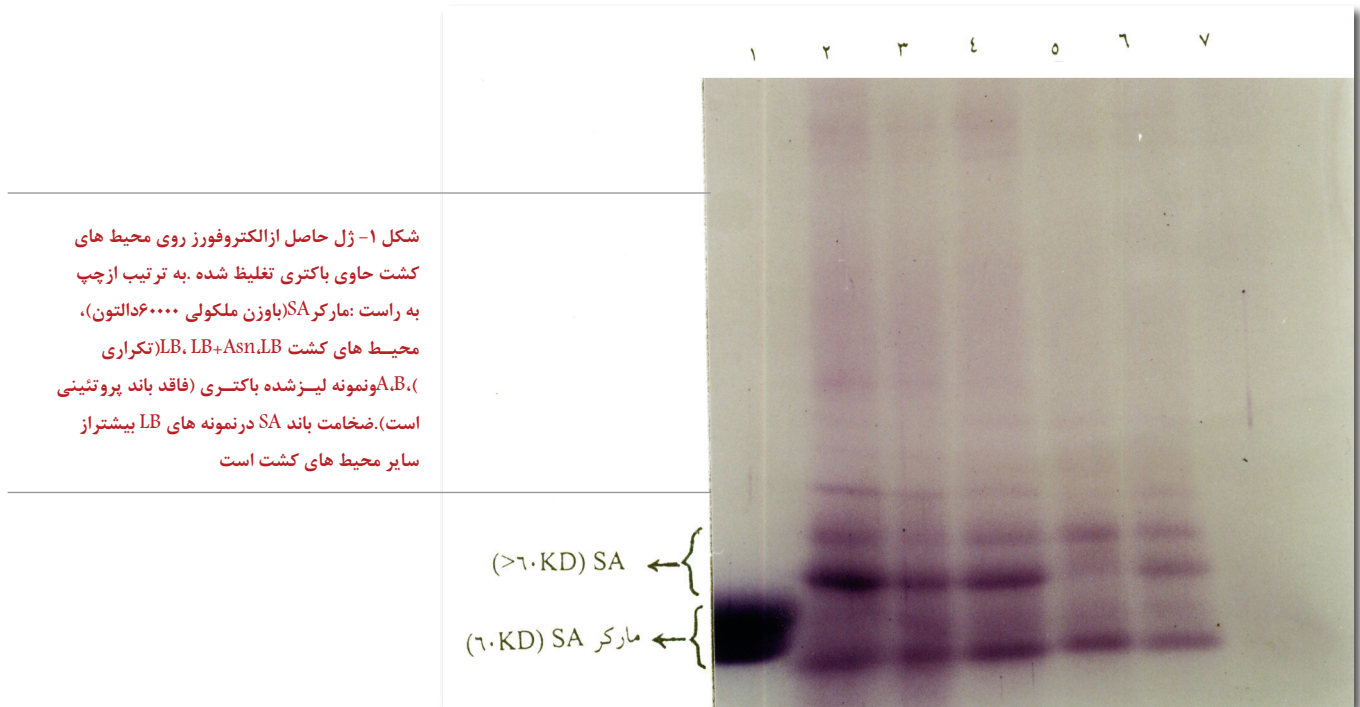
برای تخلیص، باکتری در محیط LB به میزان  $10$  لیتر کشت داده شد. تخلیص نسبی بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی و با استفاده از رزین DEAE - سلولوز، که یک تعویض کننده یون منفی است، انجام شد. فعال سازی رزین با استفاده از اسید کلریدریک  $0.5$  نرمال و سود  $0.5$  نرمال صورت گرفت و ستونی به ابعاد  $2 \times 55$  سانتیمتر آماده گردید. بافرهای مورد استفاده شامل بافر اولیه تریس - اسید کلریدریک  $0.05$  نرمال با  $\text{pH} = 7.3$  و بافر اولیه در کلرید سدیم  $7$  نرمال بود.  $70$  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  $0.8$  بود که قبلاً بوسیله صافی  $0.45$  میکرون به کمک پمپ خلاء صاف گردیده و یک شب در دمای  $10$  درجه سانتیگراد در مقابل بافر تریس - اسید کلریدریک دیالیز شده بود. در هر لوله شماره گذاری شده حدود  $3$  میلی لیتر از خروجی ستون جمع آوری و جذب هر نمونه در  $280$  نانومتر قرائت گردید (۳). برای اطمینان از خارج شدن تمامی SA موجود در نمونه پس از اینکه حدود  $150$  میلی لیتر بافر اولیه از ستون عبور کرد، ارتباط بین ظرف بافر اولیه و محلول کلرید سدیم  $7$  نرمال در بافر اولیه برقرار شد تا بتدریج قدرت یونی بافر افزایش پیدا کند. از اولین لحظه اجرای این مرحله دوباره خروجی ستون در لوله های آزمایش شماره گذاری شده جمع آوری گردید و دوباره جذب هر لوله در  $280$  نانومتر قرائت گردید (۲، ۴). کروماتوگرام نمونه های جمع آوری شده در مقابل جذبهای خوانده شده رسم گردید. کروماتوگرام شامل دو پیک بود. برای مشخص شدن اینکه SA در کدام نمونه ها خارج شده است، آزمایش الکتروفورز (باژل زیرین  $10$  و ژل بالائی  $5$ ٪) روی تعدادی از نمونه های هر پیک که جذبهای بالایی داشتند به همراه مارکر SA انجام شد و برای اثبات وجود SA در نمونه های جمع آوری 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 در نمونه لیز شده باکتری بانندی مشاهده نگردید (شکل ۱). آزمایش ایمونوبلوتینگ روی محیطهای کشت حاوی باکتری وجود SA را تأیید کرد، ولی در نمونه لیز شده باکتری بانندی دیده نشد (شکل ۲). کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی وجود دو پیک را نشان داد (شکل ۳). ژل حاصل از الکتروفورز تعدادی از نمونه های خارج شده در هر دو پیک (شکل ۴)، مشخص کرد که قسمت اعظم و خالص SA در پیک اول خارج شده و در نمونه های حاصل از پیک دوم میزان SA خارج شده جزئی و همراه با ناخالصی (حدود  $58$  میلی گرم در لیتر که باتوجه

وهر محیط کشت صاف شده به صورت جداگانه با سولفات آمونیم  $0.8$ ٪ طی مراحل زیر تغلیظ شد (۵، ۱۸): حجم مساوی از محیط های کشت در  $1500 \text{ g}$  به مدت  $20$  دقیقه سانتریفوژ شد. بر روی  $50$  میلی لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ هر محیط کشت، ضمن بهم زدن ملایم، به تدریج سولفات آمونیم (به غلظت  $560$  گرم در لیتر) اضافه شد تا با توجه به وزن مولکولی  $0.8$ ٪، A اشباع شدگی حاصل شود و بهم زدن در طول شب در  $4$  درجه سانتیگراد ادامه یافت. برای جدا کردن رسوب تشکیل شده، عمل سانتریفوژ به مدت  $20$  دقیقه در دمای  $4$  درجه سانتیگراد و در  $1000 \text{ g}$  انجام شد. بعد از اتمام سانتریفوژ مایع رویی لوله ها دور ریخته شد و رسوب هر لوله در  $4$  میلی لیتر آب مقطر حل گردید محلولهای حاصل بمدت  $24$  ساعت در دمای  $10$  درجه سانتیگراد در یک لیتر آب دوبار تقطیر (باتعویض سه بار آب مقطر) دیالیز گردیدند. محلولهای دیالیز شده به مدت یک ساعت در دمای  $4$  درجه سانتیگراد و در  $4000 \text{ g}$  سانتریفوژ شدند. در نهایت محلول رویی لوله ها که حاوی SA بود در آزمایش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید مورد استفاده قرار گرفت.

برای مشخص کردن این مسئله که در کدام محیط کشت SA بیشتری تولید شده است، روی چهار محیط کشت تغلیظ شده، مارکر SA و نمونه لیز شده باکتری توسط هموزنیتر در  $1/5$  میلی لیتر بافر فسفات نمکی (دارای فسفات سدیم  $20 \text{ mM}$ ،  $\text{pH} = 7.2$  و کلرید سدیم  $0.15$ ) (۸) آزمایش الکتروفورز با ژل زیرین  $10$ ٪ و ژل بالائی  $5$ ٪ به روش Laemmli انجام شد (۱۴). بافر نمونه دارای  $8$  میلی لیتر مخلوط  $1/2$  A میلی لیتر  $2$  - مرکاپتواتانل بود (مخلوط A شامل  $70$  میلی لیتر تریس - اسید کلریدریک  $0.5$  M با  $\text{pH} = 6.8$ ،  $16/8$  میلی لیتر گلیسرول  $2/6$  گرم SDS،  $0.02$  گرم برموفنل آبی و  $3$  میلی لیتر آب مقطر بود). هر نمونه به نسبت  $1:1$  و مارکر SA ( $5 \text{ mg/ml}$ ) به نسبت  $5:1$  بافر نمونه در لوله های پلاستیکی در دار  $15$  دقیق، و لوله ها به مدت  $2$  دقیقه در حمام آبی  $100$  درجه سانتیگراد قرار داده شدند. از هر نمونه  $20$  میکرولیتر از مارکر SA  $20$  میکرولیتر داخل چاهکها تزریق شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ  $200$  ولت حدود  $3$  ساعت طول کشید. در نهایت ژل به ترتیب: دو ساعت در محلول تثبیت کننده حاوی اسیداستیک  $0.45/5$ ٪ و متانل  $9.9/25$ ٪، دو ساعت در محلول رنگ آمیزی دارای آبی کماسی  $0.025/10$ ٪، ایزوپروپانل  $25/25$ ٪ و اسیداستیک  $10/10$ ٪ قرار داده شد. بعد جهت شفاف شدن زمینه ژل و نمایان شدن باندها ژل در محلول رنگبر حاوی اسیداستیک  $10$ ٪ و متانل  $10$ ٪ گذاشته شد. برای اثبات وجود SA، آزمایش اختصاصی ایمونوبلوتینگ انجام شد (۹، ۱۴). برای این منظور ابتدا آزمایش الکتروفورز به طریقی که ذکر شد، انجام گردید. بعد از رسیدن رنگ نشانه به حدود نیم سانتیمتری انتهای ژل، پروتئین های تفکیک شده روی ژل با اعمال شدت جریان  $100$  میلی آمپر به غشاء نیتروسلولز منتقل شدند. غشاء نیتروسلولز از ژل جدا شد و مراحل زیر به ترتیب انجام گردید: ۱- کاغذ نیتروسلولز داخل پتری دیش حاوی آلومین  $1$ ٪ (w/v) به مدت یک ساعت روی همزن قرار گرفت. ۲- کاغذ نیتروسلولز سه بار و هر بار به مدت  $10$  دقیقه با محلول  $0.05$ ٪  $\text{PBS-TWEEN}^{20}$  (دارای بافر فسفات سدیم  $20 \text{ mM}$  با  $\text{pH} = 7.2$  و کلرید سدیم  $0.15$  M) شستشو داده شد. ۳- کاغذ نیتروسلولز داخل پتری دیش حاوی IgG بیوتینه با منشأ موشی با غلظت  $0.02 \text{ mg/ml}$  قرار داده شد و پتری دیش به مدت یک ساعت روی همزن گذاشته شد. ۴- مرحله ۲ تکرار گردید. ۵- غشاء نیتروسلولز داخل پتری دیش حاوی IgG+IgM با منشأ خرگوشی کونزوگه شده با پراکسیداز (آنتی



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز روی محیط های کشت حاوی باکتری تغلیظ شده به ترتیب از چپ به راست: مارکر SA (با وزن ملکولی ۶۰۰۰۰ عددالتون)، محیط های کشت LB, LB+Asn, LB (تکراری)، A, B، و نمونه لیز شده باکتری (فاقد باند پروتئینی است). ضخامت باند SA در نمونه های LB بیشتر از سایر محیط های کشت است

{ ← SA (>60KD)  
{ ← مارکر SA (60KD)

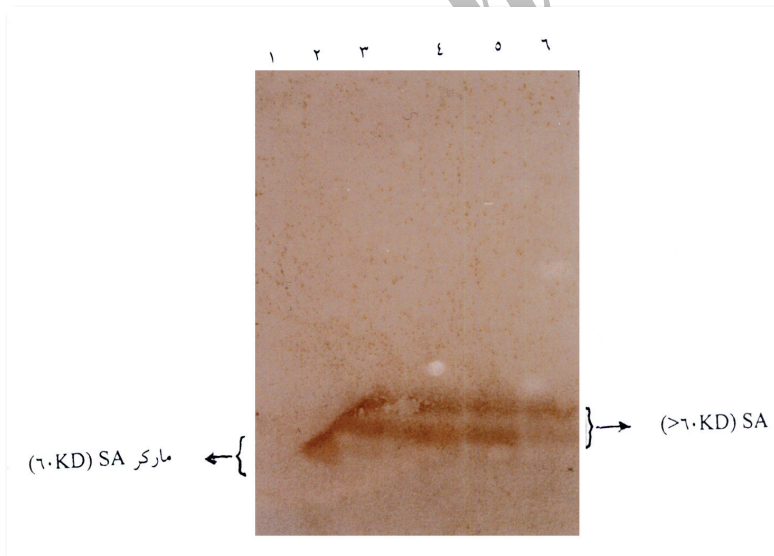
کشت LB در مقایسه با سه محیط کشت دیگر بیشتر بوده است. پس رشد باکتری در محیط کشت LB نسبت به محیط کشتهای دیگر بهتر بوده است. در محیط کشت LB + آسپاراژین، آسپاراژین به غلظت ۰/۷ گرم درصد استفاده شد، که به نظری رسد غلظت مزبور بعنوان عامل محدود کننده رشد باکتری عمل کرده است و میزان تولید SA در این محیط کشت نسبت به محیط کشت LB کمتر بود. در صورتی که آسپاراژین با همین غلظت بوسیله Cazin و همکاران (۵) در محیط های کشت مصنوعی A و B به عنوان منبع تأمین کننده ازت استفاده شده و در رشد باکتری و میزان

به جزئی و ناخالص بودن SA در پیک دوم از آن صرف نظر گردید) بوده است و آزمایش ایمونوبلوتینگ روی تعدادی از نمونه های جمع آوری شده از هر دو پیک، وجود SA و خالص و یا ناخالص بودن آن را در این نمونه ها تأیید کرد (شکل ۵).

با توجه به جذبهای خواننده شده برای ۵۰ لوله جمع آوری شده در پیک اول و با توجه به خلوص SA در این نمونه ها، با استفاده از رابطه  $A = E \cdot c \cdot l$  (جذب نمونه ها = A، ضریب جذب = E، غلظت = c، ضخامت سل = l) و ضریب جذب SA ( $E = 1/0.1 = 10$ ) میزان SA خالص شده در این روش حدود ۱۳ میلیگرم در لیتر محیط کشت LB بود.

### بحث و نتیجه گیری

از چهار محیط کشت استفاده شده در این تحقیق، دو محیط A و B مصنوعی بوده و جزو محیط های معین می باشند که این محیط ها حاوی مخلوطی از مواد غذایی غیر آلی شامل عناصر اصلی مثل ازت، منیزیم و کلسیم و همچنین گلوکز جهت تأمین کربن و انرژی هستند. عوامل رشد دیگری مانند عناصر نادر هم به این محیطها اضافه می شود تا رشد باکتری میسر شود. دو محیط کشت LB و LB+Asn مغذی بوده و جزو محیط های نامعین می باشند که مقدار و خصوصیات دقیق مواد در این محیطها مشخص نیست. عصاره مخمر و تریپتون موجود در محیط های کشت اخیر مخلوط پیچیده ای از ترکیبات شیمیایی نامشخص می باشند، که تریپتون، اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک را تأمین، در حالیکه عصاره مخمر (سلولهای مخمر نیمه هضم شده خشک) نیاز ازت را همراه با قندها و مواد غذایی آلی و غیر آلی فراهم می کند (۱، ۱۶). بررسی ژل حاصل از آزمایش الکتروفورز روی چهار محیط کشت مذکور و نمونه لیز شده باکتری نشان داد که میزان SA تولید شده در محیط



شکل ۲- آزمایش ایمونوبلوتینگ. به ترتیب از چپ به راست: نمونه لیز شده باکتری، مارکر SA و محیط های کشت A, LB+Asn, LB, B

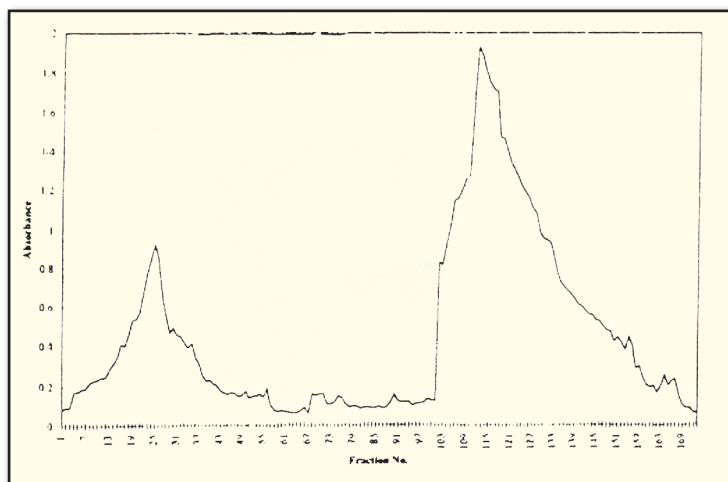


مارکر موثر می باشند و این حرکت متفاوت روی ژل با نتایج تحقیقات Diamandis و همکاران همخوانی دارد (۱۰) اشکال ۴ و ۵ نتیجه آزمایشاتی بوده که در آنها بین عمل کشت باکتری و آزمایشات تغلیظ و تخلیص به علت دیر رسیدن تعدادی از مواد لازم فاصله افتاد. لذا در این اشکال SA تخلیص شده برخلاف اشکال ۱ و ۲، با مارکر ۶۰۰۰۰ دالتونی SA در یک سطح قرار گرفته اند که ناشی از هضم پروتئولیتیک SA نمونه ها در همین فاصله زمانی بوده

است. در خاتمه با توجه به کارآئی پروتئین SA در مقایسه با پروتئین مشابهش آویدین (۱) استفاده از محیط های کشت دیگر، مطالعات ژنتیکی در مورد بیان ژن SA، بررسی کاربردهای این پروتئین و کونژوگه های آن، و نیز استفاده از روشهای اختصاصی تخلیص همچون کروماتوگرافی میل ترکیبی توصیه می شود تا با بدست آوردن شرایط تولید خالص تر و بیشتر این پروتئین بتوان آن را در مقیاس صنعتی تولید نمود که می تواند گامی در جهت بی نیازی و حتی ارزآوری برای کشور باشد.

### سپاسگزاری

از آقایان دکتر رضا حیدری، دکتر مجید صادقی زاده، دکتر بیژن رنجبر، خانم زرنیدی و آقای میرلطیف غیبی به خاطر همکاریهای صمیمانه شان تشکر و قدردانی می شود.

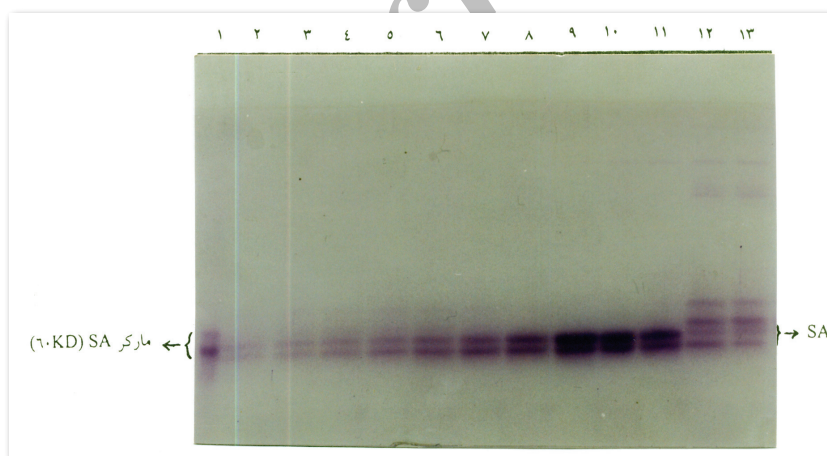


شکل ۳- کروماتوگرام تعداد نمونه های جمع آوری شده علیه جذب های خوانده شده در ۲۸۰ نانومتر در کروماتوگرافی تعویض یونی. SA خالص شده در پیک اول حدود ۱۳ میلی گرم در لیتر وکل پروتئین خارج شده در پیک دوم (SA جزئی به همراه پروتئینهای دیگر) حدود ۵۸ میلی گرم در لیتر بود

پیک اول و مقدار جزئی نیز در پیک دوم و همراه با ناخالصی (۵۸ میلی گرم در لیتر) خارج شد. پس این پروتئین به صورت ایزوفرم بوده که در قدرتهای یونی متفاوت بافر خارج می شود و این مسئله با گزارشات Hofmann و همکاران (۱۳) مطابقت دارد. به طور کلی در این روش غیر اختصاصی میزان SA خالص شده حدود ۱۳ میلی گرم در لیتر محیط کشت LB بود که 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 موید گزارشات 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.

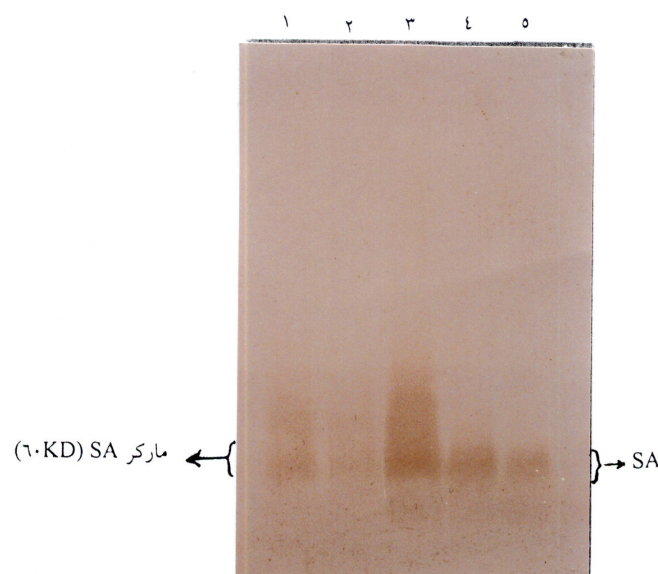
مشاهده حرکت متفاوت مارکر SA در مقایسه با SA تخلیص شده در آزمایشات الکتروفورز انجام شده به این دلیل است که معمولاً SA طبیعی (با وزن ملکولی ۶۶ تا ۷۵ کیلو دالتون) در اثر هضم پروتئولیتیک در دو انتهای آمینی و کربوکسیلی می تواند به فرمی با وزن کمتر (حدود ۶۰ کیلو دالتون) تبدیل شود که در بازار مارکرهای SA با وزن ملکولی ۶۰۰۰۰ دالتون تحت عنوان کر SA<sup>۱۷</sup> یا استریت آویدین بریده شده<sup>۱۸</sup> موجود است که تمایل SA بریده شده برای اتصال به بیوتین بیشتر از SA طبیعی است. از طرفی SA علاوه بر S. avidini در تعداد دیگری از اکتینومیسیتها و نیز اوومیسیتها 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



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 شده شماره ۰۷، ۰۹، ۱۰، ۱۳، ۱۹، ۲۱، ۲۳، ۲۵، ۲۶، ۲۸، ۱۱۳ و ۱۱۵.

ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس.  
۲- یزدان پرست، راضیه، ۱۳۷۱. راهنمای آزمایشگاه بیوشیمی، نشرنداص  
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, San Francisco, 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 discontinuous 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.



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 شده شماره 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 از باکتری *S. avidini*. پایان نامه کارشناسی