

# تولید کیموزین کامل و پردازش یافته نو ترکیب در *E-coli* و ارزیابی میزان بیان پری پلاسمایی و فعالیت آنزیمی آن‌ها

میثم احمدی زیدآبادی<sup>۱</sup> (M.Sc)، غلامرضا احمدیان<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، رحیم سروری<sup>۳</sup> (Ph.D)

۱ - دانشگاه امام حسین (ع)، تهران

۲ - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران

۳ - دانشگاه علوم پزشکی زنجان

## چکیده

سابقه و هدف: تا سال ۱۹۹۰، رنت (پروتئازهایی که باعث لخته شدن شیر و تولید پنیر می‌شوند) با روش قدیمی از شیردان گوساله‌های شیرخوار، یا از منابع گیاهی و یا میکروبی تهیه می‌گردید. در این سال اداره غذا و داروی آمریکا اجازه تولید و مصرف کیموزین گاوی نو ترکیب تولید شده توسط باکتری‌ها را صادر کرد. امروزه بیش از ۹۰ درصد پنیر مصرفی در انگلستان از کیموزین نو ترکیب تولید می‌شود. این تحقیق به منظور قطع وابستگی کشور به مایه پنیر وارداتی، بررسی بیان و عمل کرد فرم اسپلایس یافته ژن کیموزین (فرم فاقد اگزون ۶) به منظور بدست آوردن آنزیم کوچک‌تر و فعال‌تر همچنین بررسی عمل کرد سیگنال *pelB* در هدایت پروتئین به فضای پری پلاسم باکتری *E-coli* انجام گردید.

مواد و روش‌ها: با استخراج mRNA از لایه پوششی معده گوساله و انجام RT-PCR دو فرم از پر پروکیموزین (فرم پردازش یافته فاقد اگزون ۶ و فرم کامل پر پروکیموزین) بدست آمد. سپس با طراحی پرایمرهای مناسب هر دو فرم پروکیموزین در وکتور بیانی *pET26b* کلون گردید. بیان با وسترن بلات تا بید گردید و عمل کرد آن‌ها بررسی شد. یافته‌ها: هر دو فرم ژن پروکیموزین در وکتور *pET26b* تولید گردیدند. میزان تولید فرم پردازش یافته ۷ برابر فرم کامل بود. هر دو فرم پروکیموزین باعث رسوب پروتئین‌های شیر شدند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که فرم پردازش یافته و کامل پروکیموزین بعد از شوک اسمزی در فضای پری پلاسمی مشاهده نشدند. بنابراین سیگنال *pelB* قادر به هدایت هیچ یک از آن دو به فضای پری پلاسم نیست. بنابراین بایستی سیگنال جدیدی طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: کیموزین پردازش یافته، اسپارتیک پروتئاز، سیگنال *pelB*، پروتئینازهای شبه رنتی

## مقدمه

پروتئین‌های شیر و تولید لخته هستند اما این خاصیت به تنهایی جهت کاربرد آنزیم پروتئاز در پنیرسازی کافی نیست. یک مایه پنیر خوب باید به سادگی در آب حل شود، فاقد طعم نامطلوب باشد و قدرت لخته‌کنندگی بالا داشته باشد. اما پروتئاز اسیدی حاصل از منابع گیاهی و باکتریایی به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی بالا و ایجاد تلخی در پنیر مفید نیست. در

کیموزین جزئی از اسپارتیک پروتئازهای معدی است که همراه با پپسین و گاسترین می‌باشد. مولکول کاپاکازین شیر توسط آنزیم کیموزین در پیوند بین اسید آمینه فنیل آلانین ۱۰۵ و متیونین ۱۰۶ شکسته می‌شود. و باعث لخته شیر می‌شود [۱]. در واقع تعداد زیادی از پروتئازها قادر به تجزیه