"استنساخ و انتاج وتنقية صورتين متحورتين ل: ampC واللتين تم الحصول عليهما أثناء استنساخ ناتج PCR ل:Pae-ampC في البكتيريا DH5α- *E. coli*"

**بواسطة:**
علاء روبي محمود سيد

**المشرف:**
أ.د. خوان ألفونسو أيالا سيرانو
مركز البيواوجيا الجزيئية "سڤيرو أوشوا" (CBMSO/CSIC) بجامعة أوتونوما دي مدريد، أسبانيا

**الجامعة:**
جامعة أوتونوما دي مدريد (UAM)
كلية العلوم
أسبانيا

**ملخص دراسة الماچستير**

يعتبر زيادة التتعبيرالخلوي من الكروموسوم أو من البلازمد (Plasmid) عن إنزيمات AmpC عامل مهم في مقاومة مضادات البيتا لاكتام في العديد من البكتيريا سلبية الجرام مثل بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*. يصعب علاج العدوى ببكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* وذلك لأن هذه البكتيريا عندها العديد من آليات مقاومة المضادات الحيوية مثل ذيادة عمليات اخراج المضادات الحيوية، و تقليل عملية تدفق الجزيئات إلى داخل الخلية، والطفرات، وذيادة التعبير عن انزيمات AmpC بيتا لاكتاميز.

هذه الدراسة تهدف إلى استنساخ و انتاج وتنقية شكلين متحورتين لإنزيم Pae-ampC واللذان يأخذان الرمز pGEM-13 (ذو طفرة جينية $C^{152} \leftarrow T$) و pGEM-19 (ذو طفرة جينية $T^{728} \leftarrow C$).

تم استنساخ ناتج PCR للصورتين المتحورتين للجين *ampC* (pGEM-13 و pGEM-19) باستخدام البلازميد pET28b للتعبير عن البروتين AmpC في السلالة البكتيرية *E. coli* BL21(DE3). تم تنقية هذه البروتينات باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الانجزابي للنيكل ثم تجمعة وتركيز العينات التى أظهرت نشاط انزيمي عالي. أيضا تم تعيين بروتينات AmpC باستخدام تحليل SDS-PAGE و لطخة ويسترن (Western blot) ونشاط بيتالاكتاميز.

تبين من خلال هذه الدراسة أن ٢٥٠ مللي مولار من اميدازول كانت كافية لازالة بروتينات AmpC المنجزبة للراتنج (Affinity resin) أثناء عملية التحليل الكروماتوجرافي الانجزابي. أبدى تحليل SDS-PAGE و لطخة ويسترن لبروتينات AmpC احتمالية وجود الشكلين البدائي والبالغ (Precursor and mature forms). هذا بالاضافة الى تشاط بيتالاكتاميز العالى الذي ظهر بعد عملية التنقية و التركيز.

هذه الدراسة تمهد لدراسة عملية مقاومة المضادات الحيوية مع التوصيف الوظيفي والانزيمي والتركيب البلوري لبروتين AmpC في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*.