

استرپتوکیناز: استخراج، کلون‌سازی و بیان بالای پروتئین نو ترکیب فعال با رویکرد تسهیل در فرآیند خالص‌سازی

محمدرضا نژاد مقدم*، دکتر سیدمحمدحسین مدرسی**، دکتر محمد باباشمسی***، دکتر محمود چمن‌خواه***

* مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
*** مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکیناز به عنوان شناخته‌شده‌ترین داروی فیبرینولیتیک، مدت مدیدی است در درمان سکتة قلبی استفاده می‌شود. ویژگیهای ساختاری ساده این پروتئین زمینه لازم برای دستیابی به انواع نو ترکیب آن را فراهم ساخته است. هدف از این تحقیق تهیه سوش استرپتوکوک *equisimilis H46A* (پربازده از نظر تولید استرپتوکیناز) برای اولین بار در ایران بود تا پس از استخراج DNA، ژن استرپتوکیناز بگونه‌ای تکثیر شود که امکان کلون‌سازی آن در حاملهای متعدد بوجود آید.

روش بررسی: پس از استخراج DNA ژنومی ژن استرپتوکیناز از دو ناحیه با استفاده از دو پرایمر بالادست و یک پرایمر پایین‌دست ضمن در نظر گرفتن یک جایگاه آنزیم برش‌دهنده معمول برای دو سر محصولات (کل *ORF*، ۱۳۲۳ bp و قسمت مربوط به پروتئین بالغ، ۱۲۴۵ bp) تکثیر شد و در حامل *pGEX-4T-2* تحت پروموتور قوی *tac* و قابلیت بیان بالا کلون شد. پلاسمید نو ترکیب حاصل بوسیله عملیات هضم دو طرفه و تعیین توالی، تأیید و در اشریشیاکلی سویه *BL21(DE3)plysS'* ترانسفورم شد. میزان بیان و فعالیت استرپتوکیناز نو ترکیب مربوط به کلون واجد قطعه ۱۲۴۵bp با استفاده از دانسیتومتر لیزری و تست اختصاصی با سوسترای *S2251* در مقایسه با یک نمونه استرپتوکیناز خارجی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: استفاده از یک آنزیم برش‌دهنده برای دو سر قطعه ژن، کلون‌شدن آن را در تعداد زیادی از حاملهای بیانی امکان‌پذیر ساخت. میزان بیان پروتئین نو ترکیب به بیش از ۴۵٪ کل پروتئینهای میزبان، موفقیت در کلون‌سازی را تأیید کرد. وجود دم اتصالی گلوکوتانیون *S* ترانسفرز (*GST*) مانع فعالیت استرپتوکیناز نشد و مقدار آن بدون بهینه‌سازی و تخلیص شرایط کشت بیش از 115000 u/ml از کشت ثبت شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از حامل *pGEX-4T-2* ضمن تولید استرپتوکیناز نو ترکیب فعال و با بازدهی فراوان، دم *GST* را نیز به ابتدای آمینی آن اضافه می‌کند که می‌توان از آن برای تخلیص یک مرحله‌ای و آسان با استفاده از لیگاند گلوکوتانیون سود برد. **واژگان کلیدی:** *pGEX-4T-2*، استرپتوکیناز، کلون‌سازی، پروتئین نو ترکیب، تخلیص.

مقدمه

(۱). در سال ۱۹۹۵ نحوه کنترل نسخه‌برداری این ژن مورد مطالعه قرار گرفت (۲) و در سال ۱۹۹۶ فعالیت کمپلکس پروموتوری آن آنالیز شد (۳). این ژن سه نوع پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای با وزنها ۳۰، ۴۵ و ۴۷ کیلودالتون را بیان می‌کند. نوع ۴۷ کیلودالتون آن در فعال‌سازی پلاسمینوژن بیشترین نقش را دارد و همیشه مورد هدف بوده است. این پروتئین بیش از ۴۱۴ اسید آمینه دارد (۵،۴) و حداکثر فعالیت آن در

ژن استرپتوکیناز (*skc*) سوش *H46A equisimilis S.* بوسیله Malke و همکارانش در سال ۱۹۸۵ تعیین توالی شد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، دکتر محمد باباشمسی (email: babashams@avesina.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۲

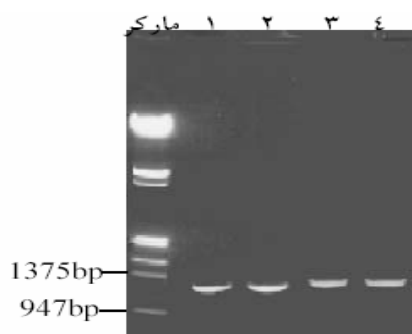
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۸

مواد و روشها

سوش S.equisimilisH46A ATCC 12449 از بانک میکروبی آمریکا، سوش‌های مهندسی شده DH5 α و BL21(DE3) و همچنین پرایمرها و آنزیم‌های محدودکننده (EcoRI و HindIII, BamHI) از شرکت سیناژن ایران، کیت PCR، آنزیم آلکالین فسفاتاز، لیزوزیم، RNaseA و سایز مارکر از شرکت Roche آلمان، IPTG از شرکت Fermentase آلمان، سوسترای S2251 از شرکت Chromogenix آلمان و تمامی نمک‌های مورد استفاده از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. تعیین توالی محصول PCR و نتیجه کلون‌سازی در مرکز ملی تحقیقات کانادا (National Research Council, Canada: NRC) و بررسی نقشه آنزیمی (Restriction enzymes) و استرپتوکیناز در سایت Webcutter 2.0 انجام شد.

استخراج DNA ژنومی از سوش S.equisimilisH46A با روش لیز سلولها (۲۰) و اصلاحات انجام شده توسط Gase و همکاری آنها انجام شد.

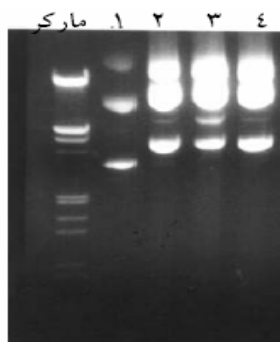
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR): با دو پرایمر بالادست
 5'-GCTGGATCCATGAAAAATTACTTATCTTTTGG3'
 ناحیه کدون شروع (برای تکثیر قطعه ۱۳۲۳ جفت باز) و
 5'-CGCGGATCCATTGCTGGACCTGAG3'
 از ناحیه مربوط به استرپتوکیناز بالغ (برای تکثیر قطعه ۱۲۴۵ جفت باز) و تک پرایمر پایین دست
 5'-GCTGGATCCTTATTTGTCGTTAGGGTTATC3'
 انجام شد. مقادیر مورد استفاده در واکنش شامل:
 ۲/۵ میکرولیتر 10XPCR buffer، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂،
 ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام dNTP، ۰/۶ میکرومولار از هر دو پرایمر، ۱ واحد آنزیم و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. از برنامه ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در ۵۰°C و ۴۵ ثانیه در ۷۲°C طی ۲۹ دور استفاده شد (۱). محصولات PCR با استفاده از سایز مارکر و عملیات هضم با آنزیم HindIII ارزیابی و تأیید شدند (شکل ۱ و ۲).



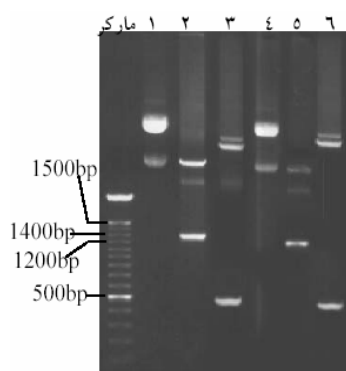
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز: ستونهای ۱ و ۲ محصولات ۱۲۴۵bp و ستونهای ۳ و ۴ محصولات ۱۳۲۳bp

PH حدود ۷/۵ است همچنین PH ایزوالکتریک آن ۴/۷ می‌باشد (۶). این پروتئین Cysteine, Cystine، فسفر، کربوهیدرات‌های کونژوگه و چربی ندارد و قسمت N ترمینال آن همواره بدون تاخوردگی است (۷) البته استرپتوکیناز تولیدی در گروه‌های استرپتوکوک‌های مختلف ساختار بسیار متفاوتی دارد (۸). مدت مدیدی است که این پروتئین به عنوان شناخته شده‌ترین داروی فیبرینولیتیک بر علیه بیماریهای ناشی از ایجاد لخته‌های خونی پراکنده در سیستم گردش خون و سکنه‌های قلبی استفاده می‌شود (۹). جدیدترین تحقیقات درباره ساختار استرپتوکیناز نشان می‌دهد ناحیه Asp41-His48 استرپتوکیناز در اتصال به پلاسمینوژن، ناحیه C-terminal در شناسایی و فعال‌سازی پلاسمینوژن و ناحیه مربوط به اسیدآمینه‌های ۴۸-۵۹ در فعال‌سازی پلاسمینوژن نقش دارد (۴). استرپتوکیناز توانایی فعال‌سازی پلاسمینوژن آزاد در خون و هم پلاسمینوژن متصل به فیبرین را دارا است. مطالعات مقایسه‌ای نشان می‌دهند که استرپتوکیناز نه تنها نسبت به سایر داروهای ترمبولیتیک مثل یوروکیناز (Urokinase) و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) امتیاز کمتری ندارد، بلکه پایین بودن هزینه تولید این دارو، آن را از سایر انواع متمایز کرده است (۴، ۱۰، ۱۱). ویژگیهای ساختاری ساده در این مولکول از جمله وجود نواحی عملکردی مستقل از هم، نداشتن اتصالات دی سولفید و گروه‌های پروستتیک و مناطق اتصال به کاتیون‌های دو ظرفیتی، بطور کلی نداشتن ساختمان فضائی سوم، زمینه لازم برای دستیابی به انواع نو ترکیب استرپتوکیناز را فراهم می‌سازد. تاکنون در مطالعات کلون‌سازی ژن استرپتوکیناز از حاملهای بیانی چون باکتریوفاج λ L47 (۱۲)، حاملهای خانواده pBR322 یا pMF5، pSK100 (۱۳)، pKK223-3 (۱۴)، pQE-30 (۱۵)، pEKG-3 (۱۶) و pHT (۱۷)، همچنین میزبانهای باسیلوس سوبتیلیس (B. subtilis WB600) (۱۸)، استرپتوکوکوس سنگوئیس (۱۵)، اشریشیاکلی (۱۶-۱۲) و مخمر (۱۰، ۱۷) استفاده شده است. براساس تجربیات قبلی در تولید استرپتوکیناز غیرنو ترکیب (۱۹)، تولید اندک سم تب‌زا در استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک گروه C و همچنین موفقیت‌های حاصل در تولید این پروتئین نو ترکیب از میزبان E.coli (۴)، ما برای استخراج ژن استرپتوکیناز از سوش S.equisimilisH46A و از E.coli بعنوان میزبان کلون‌سازی و همچنین از حامل جدیدی با ویژگی تسهیل در عملیات تخلیص استرپتوکیناز نو ترکیب انصالی استفاده کردیم.

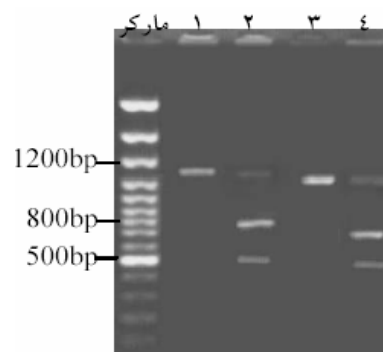
حدود 502bp را ایجاد کند) انجام شد (شکل ۴). در نهایت با عمل تعیین توالی که توسط مرکز تحقیقات ملی کانادا (NRC) انجام شد، صحت کامل توالی ژن استرپتوکیناز کلون شده و قرارگیری صحیح آن در جایگاه خواندن (Reading frame) مورد تایید قرار گرفت (۲۱). پس از تایید کلون سازی، حامل pGEX-4T-2 واجد قطعه 1323bp و 1245bp از ژن استرپتوکیناز به ترتیب pGEX-1.3-4T-2 و pGEX-1.2-4T-2 لقب گرفتند. آنگاه حامل pGEX-1.2-4T-2 در میزبانهای BL21 (DE3)22 با ژنوتیپ (rB- mB-) hsdS ompT dcm BF- gal Lambda(DE3)plyS' BL21(DE3) با ژنوتیپ (rB- mB-) hsdS ompT dcm BF- gal Lambda(DE3)[plyS Camr] و BL21(DE3)codon plus با ژنوتیپ (rB- mB-) TetR gal (DE3) hsdS ompT dcm+ endA Hte[argU proL CamR]extra copies of tRNA genes inBL21- codon plus-RP ترانسفورم شد.



شکل ۳- غربالگری کلنی های رشد یافته در محیط LB آگار واجد آمپی سیلین بعد از ترانسفورماسیون مخلوط اتصال (pGEX-4T-2 + insert): ستون ۱ حامل pGEX-4T-2 (بدون قطعه ژنی) و ستون های ۲، ۳ و ۴ pGEX-4T-2 واجد قطعه ژنی (احتمالاً pGEX-1.2-4T-2 و pGEX-1.3-4T-2).



شکل ۴- تایید حضور و صحت قرارگیری قطعه ژن توسط آزمایش هضم دوطرفه: ستون ۱ و ۴ واجد حامل pGEX-1.2-4T-2 و pGEX-1.3-4T-2؛ در صورت قرارگیری صحیح قطعات 1323bp و 1245bp درون پلاسמיד pGEX-4T-2 محصول آزمایش برش با آنزیم BamHI خروج قطعه ژنی 1323bp و 1245bp خواهد بود (ستون ۲ و ۵) و نتیجه هضم با آنزیم های HindIII و EcoRI یک قطعه 502bp خواهد بود (ستون ۳ و ۶).



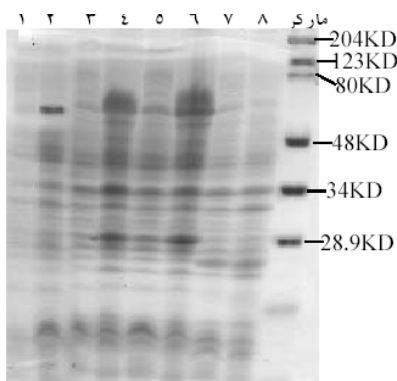
شکل ۲- تایید محصولات PCR توسط هضم با آنزیم HindIII: ستون ۱ و ۳ به ترتیب محصول 1245bp و 1323bp و ستونهای ۲ و ۴ نتیجه هضم این محصول توسط آنزیم HindIII را نشان می دهد

تکثیر حامل: حامل pGEX-4T-2 پس از ترانسفورم کردن (۲۱) در DH5α مستعد (Competent) با استفاده از روش لیزر قلیایی (۲۰) و دو اصلاح ذیل تکثیر شد: ۳ میلی لیتر کشت شبانه (overnight) را پس از سانتریفیوژ و دور ریختن ۱/۵ میلی لیتر مایع رویی به حجم ۱/۵ میلی لیتر رساندیم (به منظور امکان پذیری آزمایش در میکروتیوب). همچنین پس از اضافه کردن بافر لیزکننده I به آن، ۱۰ میکرولیتر آنزیم RNaseA (1mg/ml) اضافه کردیم (با هدف حذف RNA و همچنین حذف خودبخودی آنزیم در حین اضافه کردن محلولهای بعدی) (۲۱).

کلون سازی. هضم حامل و محصول PCR با تک آنزیم BamH I انجام شد. برای بالا بردن کارایی کلون سازی و جلوگیری از خود اتصال حامل، برداشتن فسفات از انتهای ۵' آن با استفاده از آلکالین فسفاتاز (CIP) انجام شد (۲۱، ۲۰). تمام مراحل خالص سازی قطعه ژن (insert) و حامل به روش الکتروفورز و استخراج از ژل آگاروز انجام گردید. در نهایت قطعه مورد نظر با فرآیند Ligation در حامل pGEX-4T-2 کلون شد. پس از ترانسفرم این مخلوط اتصال (Ligation mix) در سلول DH5α و کشت آن روی محیط L.B آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، کلنی های رشد یافته به عنوان کلون های واجد حامل و احتمالاً واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در حامل، این کلنی ها به صورت تصادفی انتخاب و پس از انجام عمل استخراج پلاسמיד، توسط الکتروفورز ژل آگاروز بررسی شدند (شکل ۳). تایید قرارگیری صحیح قطعه ژنی با توجه به نقشه تئوریک حامل واجد قطعه ژنی، به وسیله آزمایش هضم، یکبار با آنزیم BamHI (که بایستی قطعه دخولی را از پلاسמיד جدا کند) و بار دوم با آنزیم HindIII و EcoRI (بایستی توالی نوکلئوتیدی

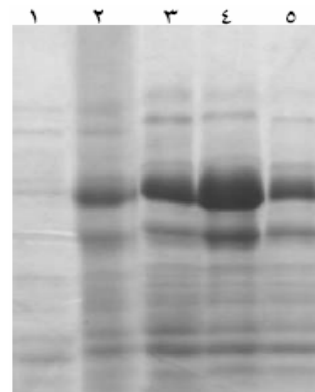
هموژنایزر، با دور ۲۲۰۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه تخریب شد، آنگاه با انجام میکروفیوژ در دور بالا محلول شفاف بدست آمد (۲۰، ۲۱). این محلول شفاف از رسوب جدا شد و به این ترتیب برای آزمایش ارزیابی فعالیت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت: در میکروپلیت الایزا به ۱۵ میکرولیتر از محلول شفاف شده ۱/۵ میکرولیتر Tris.HCl $\text{PH}=7.4$ و ۳۰ میکرولیتر plasminogen (0.2mg/ml) (تهیه شده در این آزمایشگاه) اضافه کرده، ۱۵ دقیقه در 37°C انکوبه کردیم. پس از این زمان به آن ۷۵ میکرولیتر سوبسترای کروموزنیک S2251 (5mg/ml) اضافه کرده و بعد از ۱۰ دقیقه نگهداری در 37°C واکنش را توسط ۱۰ میکرولیتر اسید استیک ۴ نرمال متوقف کردیم. در این زمان جذب نوری واکنش در طول موج ۴۰۵ نانومتر با الایزا ریدر در مقایسه با استرپتوکیناز استاندارد قرائت شد و همچنین احتمال ترشح پروتئین نو ترکیب بصورت خارج سلولی، با نمونه برداری ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و به روش ذکر شده فوق مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تعیین دقیق وزن مولکولی باند منسوب به پروتئین نو ترکیب (GST-SK) در SDS-PAGE بدین صورت عمل شد: به کمک خط کش فاصله طی شده از چاهک (Rf) برای شش باند پروتئینی مارکر به دست آمد. با توجه به رابطه معکوس بین Rf و وزن مولکولی پروتئین، منحنی مربوط به صورت نیمه لگاریتمی رسم شد. پس از رسم منحنی مربوطه با مشخص کردن Rf مربوط به باند منسوب به GST-SK بر روی محور افقی نقطه معادل آن بر محور عمودی (وزن مولکولی) پیدا شد (شکل ۷).



شکل ۶- ترانسفورم میزبانهای اشریشیاکلی DH5 α ، BL21(DE3)، BL21(DE3)plysS' و BL21(DE3)Codonplus با ساختار تأیید شده پلاسمید نو ترکیب pGEX-1.2-4T-2 و مقایسه Productivity در این سه میزبان: ستونهای ۱ و ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب قبل و بعد از القاء سویه‌های DH5 α ، BL21(DE3)، BL21(DE3)plysS' و BL21(DE3)Codonplus می‌باشند

ارزیابی بیان پروتئین نو ترکیب با این روش ساده انجام شد: ۰/۵ میلی لیتر از کشت شبانه باکتری BL21(DE3) واجد پلاسمید نو ترکیب را در ۵ میلی لیتر محیط LB جدید (حاوی $100\mu\text{g/ml}$ آمپی سیلین) کشت دادیم و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C و هوادهی با دور ۲۵۰ rpm جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm به حدود ۰/۶ رسید، در این زمان ۰/۱ میلی مولار IPTG اضافه کردیم تا عمل القاء صورت گیرد، سپس در زمانهای ۱، ۲ و ۴ ساعت هر بار ۱ میلی لیتر از کشت را برداشته وارد میکروتیوب‌های جداگانه کردیم. آنگاه این میکروتیوب‌ها با دور ۸۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر از 1X-SDS-PAGE Sample buffer اضافه کرده ۵ دقیقه شدیداً ورتکس شدند، سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و بعد از سانتریفیوژ با دور بالا از مایع رویی آنها برای انجام الکتروفورز (SDS-PAGE) و بررسی وضعیت بیان پروتئین در ساعات ذکر شده استفاده شد (۲۱) (شکل ۵).



شکل ۵- القاء کلون واجد pGEX-1.2-4T-2: ستون ۱ کلون واجد pGEX-4T-2 (کنترل منفی). ستونهای ۲ تا ۵ BL21(DE3) واجد pGEX-1.2-4T-2 به ترتیب بعد از القاء با IPTG در زمانهای ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت

آزمایش فوق برای دو سویه میزبانی BL21(DE3)plysS' و BL21(DE3)codonplus نیز جهت مقایسه میزان بیان پروتئین نو ترکیب انجام شد (شکل ۶).

تعیین فعالیت پروتئین نو ترکیب: از ۳ میلی لیتر کشت BL21(DE3)plysS' پس از ۴ ساعت القاء با IPTG، به روش ذیل لیز سلولی تهیه شد:

پس از سانتریفیوژ محیط کشت به رسوب حاصل ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده 1mM EDTA، 50mM Tris.Cl $\text{PH}=8$ ، 100mM NaCl، 0.2M PMF و $0.4/1$ میکرولیتر Lysozyme (10mg/ml) اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در 37°C دیواره باکتریهای این مخلوط توسط

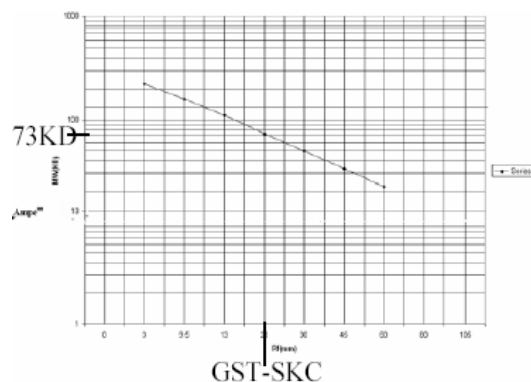
رسیدن به کدون ختم احتمالاً ترجمه می‌شوند، وزن پروتئین نوترکیب GST-SKC حدود ۷۳ کیلودالتون پیش‌بینی شد که این با منحنی نیمه‌لگاریتمی بر اساس RF و وزن مولکولی پروتئین مطابقت دارد (شکل ۷).

بیان استرپتوکیناز نوترکیب اتصالی بوسیله SDS PAGE (شکل ۶) و همچنین دانسیتومتر لیزری، بیش از ۴۵٪ کل پروتئینهای سلول میزبان ارزیابی شد. این میزان در سویه BL₂₁(DE₃)codon plus کمترین و در سویه BL₂₁(DE₃)pLysS' حداکثر می‌باشد (شکل ۶). مهمتر اینکه دم اتصالی مربوط به GST تأثیری در غیر فعال کردن استرپتوکیناز نداشت، بطوری‌که بدون بهینه‌سازی شرایط کشت و تخلیص، مجموع فعالیت حاصل از ۱ میلی‌لیتر کشت بیش از ۱۵۰۰۰ واحد محاسبه شد. ضمن اینکه در ارزیابی احتمال ترشح این پروتئین نوترکیب در محیط کشت مشاهده شد که ۲۰٪ از پروتئین نوترکیب بصورت خارج سلولی ترشح می‌شود.

بحث

از استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک گروه C که کمترین میزان توکسین‌های تبزا را تولید می‌کنند و کمترین مواد غذایی را نسبت به سوش‌های اصلی گروه A مصرف می‌کنند، به‌عنوان منبع اصلی ژن استرپتوکیناز یاد می‌شود (۴). به همین دلیل، در این تحقیق، ژن استرپتوکیناز از این سوش استخراج گردید و برای مراحل کلون‌سازی استفاده شد. گزارش شده است قسمت N ترمینال مولکول استرپتوکیناز تأثیر چندانی بر فعالیت آن ندارد (۷). بنابراین احتمال داده شد که اضافه شدن توالی اسیدآمینهای مربوط به GST به N ترمینال این پروتئین فعالیت بیولوژیکی آن را از بین نبرد، همچنان‌که افزایش ۶ اسیدآمین هیستیدینی (۱۵) و نیز دم اتصالی MBP (۲۲) این مطلب را تأیید می‌کرد. این ویژگی اساس تحقیق ما را در انتخاب حامل pGEX-4T-2 تشکیل می‌دهد.

وجود ۲۶ اسید آمینه هیدروفوب بعنوان توالی راهنما در انتهای آمینی مولکول استرپتوکیناز امکان ترشح آن را توسط استرپتوکوک‌ها فراهم می‌آورد (۱۰) اما بر اساس گزارشات موجود ترشح استرپتوکیناز نوترکیب (r-SK) بیان شده در E.coli حتی در غیاب توالی راهنما نیز می‌تواند صورت گیرد (۱۴). بر همین اساس ژن *skc* از ناحیه بعد از توالی راهنما بطول ۱۲۴۵ جفت باز نیز تکثیر شد.



شکل ۷- تعیین دقیق وزن مولکولی باند منسوب به پروتئین نوترکیب (GST-SKC) در SDS-PAGE: محور عمودی نمایانگر وزن مولکولی پروتئین با تقسیمات لگاریتمی و محور افقی نمایانگر فاصله طی شده از چاهک با تقسیمات میلی‌متر می‌باشد. RF باند مربوط به سایز مارکرهای ۲۰۴، ۱۲۳، ۸۰، ۴۸، ۳۴ و ۲۸/۹ کیلودالتون به ترتیب ۳، ۹/۵، ۱۳، ۲۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌متر بود. بر این اساس RF باند منسوب به GST-SKC حدود ۲۳ میلی‌متر بوده که مختصات آن بر محور وزن مولکولی (MW) نقطه حدود ۷۳ کیلودالتون را نشان می‌دهد

یافته‌ها

شرایط بهینه (غلظت‌های مختلف یون منیزیم و بافر، dNTP، پرایمر، آنزیم پلی‌مراز، DNA الگو و درجه حرارت‌های مختلف) برای جداسازی و تکثیر ژن استرپتوکیناز از ژنوم *S. equisimilis* H46A با استفاده از تکنیک PCR کنترل شد و روش عملی استاندارد با پرایمرهای طراحی شده به دست آمد. طی عملیات کلون‌سازی نیز لزوم بعضی اصلاحات در روش‌های موجود برای کسب نتایج مطلوب لمس شد. الکتروفورز محصولات PCR و آزمایش با آنزیم *HindIII* که طبق نقشه، محصولات را به دو قطعه بزرگتر (747bp) برای محصول 1245bp و 825bp برای محصول 1323bp و قطعه کوچکتر (498bp) برش می‌دهد، حاکی از موفقیت در جداسازی و تکثیر ژن استرپتوکیناز (قطعه 1245bp مربوط به ناحیه فعال و قطعه 1323bp باز مربوط به ORF کامل ژن) بود (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج آزمایش‌های استخراج پلاسمید و الکتروفورز (شکل ۳)، هضم دو طرفه (شکل ۴) و تعیین توالی، موفقیت انجام کلون‌سازی قطعات 1323bp و 1245bp از ژن استرپتوکیناز را در حامل pGEX-4T-2 تأیید می‌نمایند. با محاسبه تئوریک وزن خالص استرپتوکیناز (۴۷ کیلودالتون) به علاوه وزن خالص GST (۲۳ کیلودالتون) و همچنین وزن مولکولی اسید آمینه‌های دیگری که در قالب ترجمه پروتئین تا قبل از

فرآهم می‌آورند. در تحقیق حاضر از چند گونه میزبان *E.coli* که از مشتقات BL₂₁(DE₃) می‌باشند به منظور مقایسه بیان پروتئین نو ترکیب استفاده کردیم. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، میزان بیان استرپتوکوکیناز نو ترکیب (GST-SKC) در این سه گونه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد بطوری که میزان بیان در سویه BL₂₁(DE₃)codon plus کمترین و در سویه BL₂₁(DE₃)pLysS' حداکثر می‌باشد. بنابراین دلیل بیان بیشتر در سویه BL₂₁(DE₃)pLysS' به وجود موتاسیون‌های پروتئین‌سازی به نفع استرپتوکوکیناز بر می‌گردد.

با وجود امکان تولید پروتئین نو ترکیب از حاملها و میزبانهای گوناگون، هنوز هم تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب بعنوان یک مسئله مهم مطرح است. به همین دلیل مطالعات زیادی در زمینه تخلیص استرپتوکوکیناز صورت گرفته است. به نظر می‌رسد پیش‌تازترین روش، استفاده از لیگاند پلاسمینوزن باشد که در بیشتر مطالعات قبلی مورد استفاده بوده است (۴،۲۶،۲۷). این روش مستلزم مراحل متعدد استفاده از ستون تعویض یونی، دو مرحله رسوب‌گیری، کاهش حجم نمونه، تهیه ستون پلاسمینوزن-سفارز 4B و آسیلاسیون پلاسمینوزن و استفاده از بافرهای متعدد است. اما کلون نمودن ژن استرپتوکوکیناز در حامل pGEX-4T-2، استرپتوکوکیناز نو ترکیبی واجد دنباله اتصالی گلوکوتایون اس ترانسفراز را حاصل می‌آورد که می‌توان آن را بوسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی با لیگاند گلوکوتایون تخلیص کرد (۲۰، ۲۴). در این روش می‌توان از امتیازات یک مرحله‌ای شدن عمل تخلیص، کاهش میزان واسرشتگی، عدم تغییر pH فیزیولوژیکی پروتئین، عدم اضافه کردن خاصیت آنتی‌ژنیک جدید و کاهش تعداد بافرها و محلولهای مرحله تخلیص سود برد. پروتئین ترومبین قادر به شناسایی جایگاه اسیدآمینه‌ای بین SKC و GST می‌باشد و در صورت نیاز می‌توان با استفاده از این جایگاه دنباله GST را از SKC جدا کرد (۲۴).

تولید استرپتوکوکیناز نو ترکیب با بازدهی فراوان و قابلیت تخلیص آسان در مقیاس صنعتی، می‌تواند گامی موثر در جهت تولید ماده اولیه این داروی ژنریک در کشور باشد که سالانه بیش از یک میلیون دلار هزینه صرف خرید ۵۰ هزار آمپول مصرفی آن می‌شود (۲۸). از فوائد دیگر قابل دسترس بودن کلون حاصل، امکان مطالعات دیگر همچون استفاده از دیگر حاملها، سلولهای بیانی، جهش‌زایی، کاهش ایمونوژنیسیته و بهینه‌سازی شرایط تولید (فاکتورهای موثر بر بیان پروتئین مانند دما، نوع محیط کشت، غلظت القاء‌کننده، انواع القاء

برخلاف مطالعات مشابه (۲، ۱۷-۱۱) برای اولین بار طراحی پرایمر و استراتژی PCR، با هدف تعبیه سایت شناسایی BamHI در دو انتهای توالی ژنی تکثیر شده انجام گرفت. این استراتژی، کلون‌سازی محصولات PCR (ژن *skc*) را در حاملهای بیانی متعدد امکان‌پذیر می‌سازد و سبب می‌شود قطعه ژن درست بعد از توالی پروتئینی GST قرار گیرد. با توجه به اینکه آخرین کدون در سمت ۳' ژن *skc* توالی ختم ترجمه (TAA) می‌باشد، انتظار می‌رود که اسیدآمینه اضافی دیگری در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار نگیرد. ولی در صورتی که به هر دلیل این کدون ختم عمل نکند، کدون ختم موجود در حامل (TGA) که بعد از ناحیه MCS قرار گرفته است موجب ختم ترجمه خواهد شد. در این صورت تعداد ۱۲ اسیدآمینه دیگر به انتهای کربوکسیل پروتئین افزوده خواهد شد. به این ترتیب با دانستن وزن مولکولی اسید آمینه‌های اضافه شده به مولکول و جمع آنها با وزن مولکولی پروتئین SKC (۴۷ کیلو دالتون)، می‌توان وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب (GST-SK) را حداقل ۷۳ و حداکثر ۷۴ کیلو دالتون پیش‌بینی کرد. در روش غربالگری برخلاف روش شناسایی کلون‌های صحیح به روش α -complementation (۱۷، ۲۰)، مستقیماً از این ویژگی که باکتری‌های دریافت‌کننده ساختار pGEX-4T-2 به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم خواهند شد، استفاده گردید، این امر سبب صرفه جویی در زمان می‌شود.

در مطالعات گذشته بیان پروتئین r-SK در باکتری *E.coli* تحت اثر پروموتورهای مختلف به میزان ۵۲٪ (۱۲) و ۲۵٪ (۱۶) از کل پروتئینهای سلول گزارش شده است. در این تحقیق نیز با استفاده از حامل pGEX-4T-2 و پروموتور *tac* میزان بیان پروتئین نو ترکیب بدون بهینه‌سازی شرایط به حدود ۴۵٪ از کل پروتئینهای باکتری رسید. بطوری که میزان فعالیت آن بیش از ۱۵۰۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مقایسه با مطالعات مشابه (۲۳) و استرپتوکوکیناز استاندارد مطلوب می‌باشد. ضمناً آزمایش بیان در محیط مایع LB انجام گرفت در حالی که با غنی کردن محیط کشت و در نتیجه تقویت روندهای متابولیکی باکتری، افزایش میزان پروتئین نو ترکیب حتمی خواهد بود (۴). در این مطالعه حضور IPTG به میزان ۰/۱ میلی‌مولار باعث روشن شدن اپرون و شروع سنتز mRNA شد. این در حالی است که در موارد دیگر برای بیان پروتئینهای نو ترکیب غلظتهای بیشتری از IPTG بعنوان غلظت مناسب معرفی شده‌اند (۲۴، ۲۵).

میزبانهای بیانی با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و یا موتاسیون در پروتئین‌های خود امکان بیان بیشتر پروتئین را

سازمانهای یاد شده بخاطر حمایت مالی و همچنین آقای مهدی ملکی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بخاطر همکاری در قسمت ارزیابی فعالیت پروتئین نو ترکیب قدردانی می‌گردد.

کننده، زمان القاء، مدت زمان القاء و پیدا کردن فاز لگاریتمی رشد باکتری در هنگام القاء) است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از دو پروژه تحقیقاتی سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور مصوب شورای پژوهش‌های علمی کشور و معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی می‌باشد. بدین وسیله از

REFERENCES

1. Nejadmoqaddam MR, Modaresi MH, editors. Topic parameters for PCR optimization. 1st edition. Acecr publication, 2005.
2. Gase K, Ellinger T, Malke H. Complex transcriptional control of the streptokinase gene of streptococcus equisimilis H46A. Mol Gen Genet 1995;247(6):749-58.
3. Gase K, Gase A, Schirmer H, Malke H. Cloning, sequencing and functional overexpression of the streptococcus equisimilisH46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. Eur J Biochem 1996;239(1):42-51.
4. Banerjee A, Yusuf Chisti UC. Streptokinase; a clinically useful thrombolytic agent. Biotech Adv 2004;22:287-307.
5. Malke H, Gerlach D, Kohler W, Ferretti JJ. Expression of a streptokinase gene from Streptococcus equisimilis in Streptococcus sanguis. Mol Gen Genet 1984;196(2):360-3.
6. De Renzo EC, Siiteri PK, Hutchings BL, Bell PH. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. J Biol Chem 1967;242(3):533-42.
7. Tueten AG, Broadhurst RW, Smith AGR, Dobson MC. Characterization of structural and folding properties of streptokinase by N.M.R. spectroscopy. Biochem J 1993;290:313-19.
8. Huang T, Malke H, Ferretti J. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. Infect Immun 1989;57(2):502-6.
9. Karen GRN, Gold M. Acute coronary syndromes: New developments in pharmacological treatment strategies. Crit Care Nurse 2000;20:2.
10. Campbell T, editor. Thrombolysis following acute myocardial infarction. An initiative of NSW Clinical Pharmacologists & Pharmacists Funded by the NSW Department of Health. 2nd edition. 1999.
11. Kumar R, Singh J. Expression and secretion of a prokaryotic streptokinase without glycosilation and degradation. Schizosaccharomyces Pombe Wiley InterScience 2004;21(16):1343-58.
12. Malke H, Ferretti JJ. Streptokinase: cloning, expression and excretion by Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 1985;81:3557-61.
13. Ko JH, Park DK, Kim IC, Lee SH, Byun SM. High-level expression and secretion of streptokinase in Escherichia coli. Biotech Lett 1995;17:1019-24.
14. Avilan L, Yarzabal A, Jurgensen C, Bastidas M, Cruz J, Puig J. Cloning, expression and purification of recombinant streptokinase: partial characterization of the protein expressed in Escherichia coli. Bra J Med Biol Res 1997;30(12):1427-30.
15. Caballero AR, Lottenberg R, Johnston KH. Cloning, expression, sequence analysis, and characterization of streptokinases by porcine and Equine Isolates of Streptococcus equisimilis. Infect Immun 1999;67(12):6478-86.
16. Estrada MP, Hernandez L, Perez A, Rodriguez P, Fuente de la, Herrera L. High-level expression of streptokinase in E.coli. Biotechnology 1992;10:1138-42.
17. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, Wood PJ, Stroman DW. Expression of streptokinase in Pichia pastoris yeast. Enzyme Microb Tech 1989;11:650-56.

18. Wu XC, Ye RQ, Duan YJ, Wong SL. Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in *Bacillus subtilis*: streptokinase with longer functional half-life. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(3): 824-9.
۱۹. رضویان س م ح. استخراج و تخلیص استرپتوکیناز از استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک گروه C. پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، سال ۱۳۸۲.
20. Sambrook J, Russell D, editors. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3rd edition. CSHL press, 2001.
۲۱. نژادمقدم م ر. استخراج، کلون سازی و بیان ژن استرپتوکیناز با استفاده از *streptococcus equisimilis H46A*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم.
22. Sazonova IY, Houg AK, Chowdhry SA, Robinson BR, Hedstrom L, Reed GL. The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. *J Biol Chem* 2001;276(16):12609-13.
23. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *E.coli*. *Microbiol Res* 1996;60(3): 512-38.
24. Amersham Biosciences. GST gene fusion system handbook. edition AA, 2004;18:1157-58. available at: www4.amershambiosciences.com.
25. Shibui T, Nagharia K. Secretion of a functional Fab fragment in *E.coli* and the influence of culture conditions. *Appl Microbiol Biotech* 1992;37(3):352-7.
26. Rodriguez P, Hernandez L, Munoz E, Castro A, Fuente JDL, Herrera L. Purification of streptokinase by affinity chromatography on immobilized acylated human plasminogen. *Bio Techniques* 1992;12(3):424-29.
۲۷. باباشمسی م، رضویان م ح، نژادمقدم م. تولید و خالص سازی استرپتوکیناز به روش کروماتوگرافی تمایلی حفاظت شده. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، سال ۱۳۸۲، جلد ۴، صفحات ۹۲-۸۹.
۲۸. معاونت غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. آمار سال ۱۳۷۸، لیست داروهای وارداتی.