

کلونینگ و بیان مولکول های کوتاه شده و دست نخورده استرپتوکیناز در اشیشیا کلی و ارزیابی فعالیت بیولوژیک آن ها

رضا عربی¹، فرزین روحوند^{2*}، داریوش نوروزیان²، محمدرضا آقا صادقی²، آرش معمار نژادیان²، حسین خان احمد²، سید مهدی سادات³؛ فاطمه متولی³

¹ دانشجوی دکترای فرآورده های بیولوژیک، انستیتو پاستور ایران

² عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران

³ کارشناس ارشد انستیتو پاستور ایران

چکیده

استرپتوکیناز پرمصرف ترین دارو در درمان ترومبولیتیک عروق خونی به شمار می آید. با وجود این، به علت غیرانسانی بودن منشا آن و فعالیت غیراختصاصی در غیاب فیبرین، کاربرد آن با عوارض آلرژیک و ضایعات هموراژیک همراه می باشد. اثبات شده است که انواع کوتاه شده ای از استرپتوکیناز، درحالی که بیشترین فعالیت خود را حفظ کرده اند اختصاصیت بیشتری نسبت به فیبرین پیدا کرده و فاقد برخی نواحی آنتی ژنیک خود هستند. در این پژوهش استرپتوکینازهای کوتاه شده SKc143-386 و SKc60-386 به همراه استرپتوکیناز کامل در دو وکتور بیانی pQE30 و pET41a کلون شدند. در حالی که، استرپتوکیناز کامل در هر دو نوع وکتور بیان شد، pET41a تنها وکتور موثر در تولید انواع کوتاه شده استرپتوکیناز بود. pET41a دارای سه برچسب قبل از جایگاه آنزیمی خود می باشد که احتمالاً از بروز مشکلاتی همچون بیان ژن های هترولوگ نوترکیب در اشیشیاکلی جلوگیری می کند. بررسی SDS-PAGE و وسترن بلات پروتئین های تخلیص شده، درست بودن اندازه و ماهیت پروتئین های تولید شده را نشان داد. بررسی فعالیت اختصاصی پروتئین های SK143-386، SK60-386 و استرپتوکیناز کامل با استفاده از روش دقیق رنگ سنجی نشان دهنده کاهش 83 تا 91 درصدی در فعالیت انواع کوتاه شده بود. این پژوهش، مطالعه اولیه ای برای مقایسه فعالیت اختصاصی پروتئین های کوتاه شده و دست نخورده استرپتوکیناز تولید شده می باشد. برای بررسی اختصاصیت به فیبرین و همچنین میزان آنتی ژنیسیته نیاز به آزمون های بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی: استرپتوکیناز، پروتئین های کوتاه شده، کلونینگ، فعالیت بیولوژیک

رشته های فیبرین را به طور ناکامل تجزیه کرده و در عوض فیبرینوژن پلازما را به صورت کامل تجزیه می کند. این خصوصیت دلیل عمده ایجاد خونریزی های غیر قابل کنترل در درمان با استرپتوکیناز است. مشخص شده است که 59 اسیدآمینه موجود در ابتدای آمینی استرپتوکیناز در تجزیه فیبرینوژن نقش داشته و حذف این ناحیه منجر به عملکرد اختصاصی مولکول استرپتوکیناز تنها در حضور رشته های فیبرین می گردد که به این ترتیب امکان ایجاد هموراژی کاهش می یابد (Panizzi et al., 1995; Reed et al., 2006). همچنین استرپتوکیناز در شرایط فیزیولوژیک هنگام حل کردن لخته در مدت کوتاهی توسط پلازمین در نواحی لیزین 59 و لیزین 386 تجزیه شده و سه قطعه 59-1، 414-387 و 386-60 ایجاد می شوند، که تاکنون برای قطعه 387-414 فعالیت خاصی مشخص نشده است (Nihalani et al., 2006; Panizzi et al., 1998). همچنین مطالعات نشان داده اند که حذف 142 اسید آمینه اول استرپتوکیناز باعث کاهش فعالیت مولکول به 60 درصد فعالیت ماکزیمم، اما در مدت زمان طولانی تری گشته و به عبارت بهتر سرعت عمل آن نیز کاهش می یابد. این در حالی است که مولکول کامل حداکثر فعالیت را در مدت دو دقیقه دارد. از طرفی، قطعات پپتیدی 59-1، 142-1 و 387-414 دارای اپی توپ های متعدد آنتی ژنیک هستند (Nihalani

تشکیل لخته خونی در سیستم گردش خون ممکن است باعث بسته شدن رگ های خونی، بروز سکتة های قلبی-مغزی و نهایتاً مرگ گردد. در چنین مواردی، عوامل ترومبولیتیک یا فیبرینولیتیک، مانند استرپتوکیناز، فعال کننده پلازمینوژن بافتی¹ و یوروکیناز، به عنوان داروهای حل کننده لخته خون تجویز می شوند (Banerjee et al., 2004; Baruah et al., 2004). در میان این سه دارو، استرپتوکیناز² که از همه ارزان تر می باشد یک آنزیم خارج سلولی است که به وسیله باکتری استرپتوکوک بتا همولیتیک تولید می شود. این آنزیم یک پلی پپتید تک زنجیره ای است که دارای وزن مولکولی 47 کیلو دالتون بوده، از 414 اسید آمینه تشکیل شده و دارای سه دمین ساختمانی α و β و γ می باشد که مطالعات زیادی در مورد نقش این سه دمین انجام پذیرفته است (Reed et al., 1999; Sazonova et al., 2004; Wong et al., 1994). متأسفانه، علیرغم قابلیت بالای استرپتوکیناز در حل کردن لخته و نیز صرفه اقتصادی استفاده از این دارو، کاربرد آن با مشکلاتی نیز مواجه است که از آن جمله، ایمنوژن بودن استرپتوکیناز و همچنین مهار عمومی سیستم انعقادی و در نتیجه ایجاد عوارض هموراژیک قابل ذکر اند (Banerjee et al., 2004; Baruah et al., 2004).

¹ Tissue Plasminogen Activator (tPA)

² Streptokinase

سویه استاندارد ATCC9542 در آن کلون شده بود) به عنوان الگو برای تکثیر ژن های *SKc1-414* و *SKc60-386*، *SKc143-386* استفاده شد. وکتور های pQE30 (دارای پروموتور T5، QIAGEN) و pET41a (دارای پروموتور T7، NOVAGEN) (شکل 1) برای کلونینگ انتخاب شده و به روش هضم آنزیمی تایید شدند. از کیت High pure PCR (Roche, product purification kit Germany) برای تخلیص قطعات ژنی از محلول ها و ژل استفاده گردید. ژن ها و وکتور ها توسط آنزیم های *BamHI* و *PstI* (Fermentas, Lithuania) هضم شده و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز توسط کیت از ژل استخراج شدند. قطعات ژنی توسط آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas, Lithuania) به درون وکتور ها وارد شده و پلاسمیدهای نو ترکیب *pQSK1-414*، *pQSK60-386*، *pQSk143-386*، *pETSK1-414*، *pET60-386* و *pETSK143-386* ساخته شدند.

1998, et al.) که حذف آنها می تواند در کاهش عوارض آلرژیک ناشی از تجویز این پروتئین باکتریایی موثر باشد. هدف از این پژوهش بهینه سازی عملکرد مولکول استرپتوکیناز با حذف نواحی اسید آمینه ای 1-59، 1-142 و 387-414 مولکول استرپتوکیناز بود. به این ترتیب، دو مولکول مهندسی شده *SK60-386* و *SK143-386* که نواحی آنتی ژنیک کمتری را دارا هستند به صورت نو ترکیب در باکتری *E. coli* بیان و تخلیص شده و تغییرات فعالیت بیولوژیک پروتئین های حاصل با پروتئین دست نخورده استرپتوکیناز مقایسه شد.

مواد و روش ها

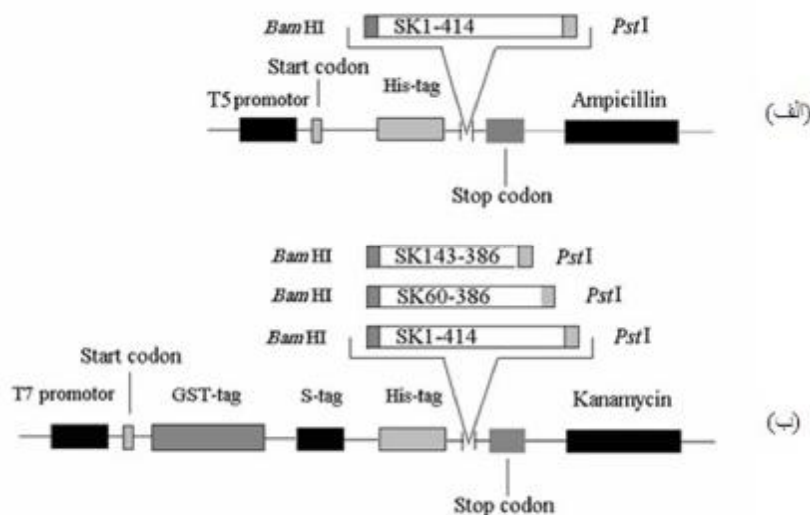
تکثیر ژن ها و کلونینگ

آغازگرها (جدول 1) توسط نرم افزار GENE RUNNER (Version 3.05) طراحی و به وسیله شرکت سیناژن (ایران، تهران) ساخته شدند. از سازه *pUC18SK* (که قبلاً ژن *skc2* از

جدول 1- آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن های *SKc143-386*، *SKc60-386* و *SKc1-414*.

نام آغازگر	توالی آغازگر
Primer name	Primer sequence
Pf60	5'- CGAGGATCCAGTCCAAAATCAAACACC-3'
Pf143	5'- ATAGGATCCCATGTGCGCGTTAGAC-3'
Pr386	5'- CCGCTGCAGTTACTAGGCTAAATGATAGCTAG-3'
Pf1	5'- GAAGGATCCATTGCTGGACCTGAGTG-3'
Pr414	5'- ATCTGCAGTTATTTGTCGTTAGGGTTATCAGG-3'

Table 1 – primers used for amplification of *skc60-386*, *skc143-386* and *skc1-414*.



شکل 1- الف) نقشه پلاسمید pQE30. این پلاسمید تحت کنترل پروموتور T5 بوده و دارای یک برچسب پلی هیستیدین بعد از کدون شروع و قبل از جایگاه ورود ژن می باشد. ب) نقشه پلاسمید pET41a؛ این پلاسمید تحت کنترل پروموتور T7 بوده و دارای سه برچسب پلی هیستیدین، S tag و GST tag بعد از کدون شروع و قبل از جایگاه ورود ژن می باشد.

Figure 1- A) a part of pQE30 plasmid map. This plasmid works under the control of T5 promoter and has a poly His tag in the upstream of its multiple cloning site, *skc1-414* was cloned in the *Bam*HI and *Pst*I site of the vector; B) a part of pET41a vector map; this plasmid works under the control of T7 promoter and there are three tags including poly His tag, S-tag and Gst-tag in the upstream of its multiple cloning site; *skc143-386*, *skc60-386* and *skc1-414* were inserted in the *Bam*HI and *Pst*I site of the vector.

پس از انجام هضم آنزیمی با آنزیم های برشی مختلف و بررسی اندازه قطعات ایجاد شده، برای اطمینان از درستی توالی نوکلئیدی و عدم وجود موتاسیون در ژن های کلون شده توالی نوکلئیدی آنها مورد بررسی قرار گرفته و تعیین شد (Seqlab, Germany). کلون های مورد تایید نهایی برای نگهداری دراز مدت در ویال های حاوی 80% گلیسرول و برای استفاده کوتاه مدت در محیط کشت

سازه های حاصل به درون سلول های صلاحیت دار *E.coli* DH5a ترانسفورم شده و پس از پدیدار شدن کلنی ها روی محیط دارای آنتی بیوتیک (آمپی سیلین برای سلول های حاوی وکتور pQE30 و کانامیسین برای سلول های حاوی وکتور pET41a) تعدادی از آن ها انتخاب شده و از روش Colony PCR برای تایید اولیه وجود پلاسمید نوترکیب استفاده گردید. در نهایت

شد. رسوب سلولی با 50 میکرولیتر بافر لیز کننده (حاوی اوره 8 مولار، سدیم دی هیدروکلراید 10 میلی مولار) مخلوط شده و وجود پروتئین ها با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شدند (شکل 2). با توجه به اینکه پلاسمیدهای بکار گرفته شده جهت کلونینگ امکان بیان بر چسب هیستیدینی (6xHis) را به صورت متصل به ابتدای آمینی پروتئین نوترکیب فراهم می آورند (شکل 1)، درستی پروتئین های بیان شده با استفاده از تکنیک وسترن بلات با آنتی بادی ضد برچسب هیستیدین به عنوان آنتی بادی اولیه و آنتی بادی ضد آنتی بادی موشی کنژوگه شده با آنزیم پراکسیداز ترب کوهی ارزیابی شد. تخلیص پروتئین های تایید شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی با نیکل به روش دناتوره (با استفاده از اوره 8 مولار) توسط ژل Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) انجام گرفت. حذف اوره و Refolding پروتئین ها با استفاده از کیسه های دیالیز (cut off = 2.5 kDa) و بافر (فسفات 0/1 میلی مولار، گلیسین 50 میلی مولار) انجام شد. غلظت پروتئین های تخلیص شده به روش Lowry و با استفاده از کیت BCA (Pierce) و همچنین با روش جذب نوری (با دستگاه پیکودراپ) در طول موج 280 نانومتر اندازه گیری شد.

LB agar نگهداری شدند. پلاسمیدهای تأیید شده در مرحله بعد به درون میزبان بیانی *E. coli* M15 (در مورد پلاسمیدهای ساخته شده در pQE30) و *E. coli* B121 (در مورد پلاسمیدهای ساخته شده در pET41a) ترانسفورم شدند. چند کلنی از میان کلنی های رشد کرده انتخاب شده و پس از تایید مجدد، کلنی های مثبت در گلیسرول 80% و محیط کشت LB agar نگهداری شدند.

بیان و تخلیص پروتئین های نوترکیب

کلون های حاوی سازه های ژنی ابتدا در محیط TY2X (تریپتون، 16 گرم بر لیتر، عصاره مخمر 10 گرم بر لیتر و کلرید سدیم 5 گرم بر لیتر) حاوی آنتی بیوتیک مناسب (بر اساس نوع و کتور استفاده شده) تلقیح شده و به مدت 12 تا 16 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد رشد داده شدند. از سوسپانسیون سلولی حاصل به نسبت 1:50 به درون محیط کشت جدید TY2X تلقیح گردید و در شیکر انکوباتور با دور rpm 200 و دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. وقتی کدورت کشت باکتریایی در طول موج 600 نانومتر به 0/5 - 0/6 رسید، IPTG با غلظت نهایی 0/1 میلی مولار تلقیح گردید و دوباره به مدت 5 ساعت گرمخانه گذاری با همان شرایط ادامه داده شد. توده سلول توسط سانتریفوژ با دور rpm 10000 رسوب داده

اندازه گیری فعالیت استرپتوکیناز

برای اندازه گیری فعالیت حیاتی پروتئین های استرپتوکیناز از روش کیفی لیز کازئین (Caseinolysis Assay) (Anonymous.,2003) و همچنین روش کمی رنگ سنجی (Colorimetric Assay) استفاده گردید (Nihalani et al.,1998؛ Panizzi et al.,2006). در روش لیز کازئین ابتدا مخلوطی از skim milk (5درصد)، آگارز (10 درصد)، کلرید سدیم (10 میلی مولار)، تریس (50 میلی مولار) تهیه شده و پس از انجام اتوکلاو این مخلوط در یک ظرف پتری ریخته شد. پس از سرد شدن با استفاده انتهای یک پی پت پاستور استریل چاهک هایی به قطر تقریبی 5 میلی متر در فواصل مناسب و مساوی ایجاد گردید. ابتدا 50 میکرولیتر از داروی تزریقی استرپتوکیناز (B. Braun, Germany) به عنوان استاندارد با سه رقت (فعالیت) مشخص در سه چاهک مختلف ریخته شده و در چاهک های دیگر استرپتوکیناز های نوترکیب تخلیص شده، که فعالیت آن ها مجهول می باشد ریخته شد. به همه چاهک های مذکور 50 میکرولیتر پلاسمینوزن انسانی (Fluka, Sweden) با غلظت یک میلی گرم بر لیتر اضافه گردید. دو چاهک کنترل منفی نیز، که به ترتیب حاوی 50 میکرولیتر آب به همراه استرپتوکیناز و 50 میکرولیتر آب به همراه پلاسمینوزن انسانی

(یک میلی گرم بر لیتر) بودند تهیه شدند. پلیت به مدت 16 ساعت در 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس هاله های شفاف که در اطراف چاهک های نمونه و استاندارد در اثر لیز کازئین موجود در شیر ایجاد شده بودند مورد بررسی و تفسیر قرار گرفتند. در روش رنگ سنجی 50 میکرولیتر از غلظت های مختلف استرپتوکیناز استاندارد و نیز نمونه های نوترکیب تخلیص شده به صورت جداگانه با 50 میکرولیتر از پلاسمای تازه انسانی در درون چاهک های میکروپلیت 96 خانه ای مجاور شده و به مدت 10 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس به همه خانه ها 50 میکرولیتر از غلظت 0/75 میلی مولار سوبسترای کروموزنیک (H-D-valyl-) S2251 (L-leucyl-L-lysine-p-nitroanalide) اضافه شده، دوباره به مدت 20 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. برای توقف واکنش از 25 میکرولیتر اسید استیک 25 در صد استفاده شد. بلافاصله میزان رنگ ایجاد شده به وسیله اسپکتروفوتومتر با طول موج 405 نانومتر خوانده شد و بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده نتایج به وسیله برنامه Parallel Line Assay بر حسب واحد بین المللی بر میلی لیتر (IU/mL) به دست آمد و از لحاظ Regression و Parallelism بررسی شد. سپس فعالیت اختصاصی

شدند. هضم آنزیمی سازه های حاصل درستی کلونینگ و تعیین توالی ژن ها عدم موتاسیون را در آن ها را تایید کردند. سازه های تایید شده در سویه بیانی (DE3) BL21 ترانسفورم و به دنبال القا با IPTG بیان شدند. باندهای پروتئینی SK143-386، SK60-386 و SK1-414 به ترتیب با وزن های حدود 60، 66 و 79 کیلو دالتون بر روی ژل پلی اکریل آمید در جایگاه مورد انتظار مشاهده شدند (شکل 2-2-الف). همچنین وسترن بلاتینگ عصاره های سلولی بیان پروتئین های SK143-386، SK60-386 و SK1-414 بصورت فیوژن با 6xHis-tag را تایید کرد (شکل 2-ب). پروتئین ها به وسیله ستون های کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص شده و Refolding آن ها با استفاده از کیسه دیالیز انجام شد.

مقایسه فعالیت مولکول های کوتاه شده و کامل استرپتوکیناز نو ترکیب

روش کازئینولیز: از روش کازئینولیز برای بررسی اولیه (کیفی) فعالیت استفاده شد. نتایج نشان داد که هاله لیز کازئین در اطراف چاهک مربوط به SK1-414 نسبت به SK60-386 و هاله مربوط به SK60-386 از SK143-386 بیشتر بود (شکل 3). روش کروموزنیک: در این روش از سه رقت استاندارد بین المللی استرپتوکیناز (B. Braun،

پروتئین ها با تقسیم فعالیت زیستی آن ها بر غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر و میکرومول بر میلی لیتر) محاسبه گردید.

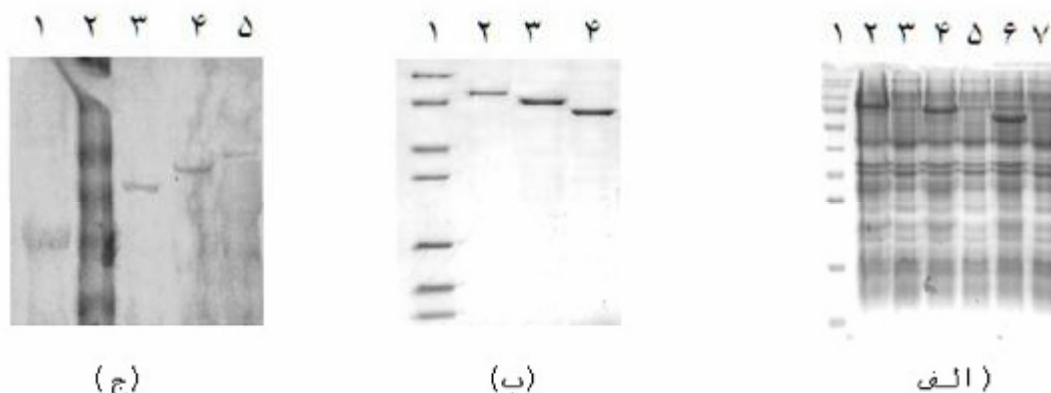
نتایج

کلونینگ، بیان و خالص سازی پروتئینهای نو ترکیب

قطعات ژنی *skc60-386* و *skc143* پس از انجام PCR و ایجاد محل برش آنزیم های *PstI* و *BamHI* در پلاسمید pQE30 کلون شدند. سازه های حاصل به نام های pQESK60 و pQESK143 به درون سویه بیانی M15 ترانسفورم شده و سپس بیان شدند. باوجود استفاده از غلظت های مختلف IPTG و القا در مراحل مختلف رشد ($OD_{600} = 0/5-1$) هیچ باند پروتئینی در ناحیه مورد انتظار (39 کیلو دالتون برای SK60-386 و 30 کیلو دالتون برای SK143-386) در ژل پلی آکرل آمید مشاهده نشد. اما، باند مربوط به SK1-414 (که قبلا ژن آن کلون شده بود) با وزن مولکولی 47 کیلودالتون در ژل ظاهر گردید. وسترن بلاتینگ عصاره های سلولی نیز عدم بیان و یا احتمالا بیان بسیار کم پروتئین های کوتاه شده را تایید کرد. سپس ژن های مذکور و همچنین *skc1-414* در وکتور pET41a وارد شدند و به ترتیب پلاسمیدهای pETSK60، pETSK143 و pETSK414 ساخته و تایید

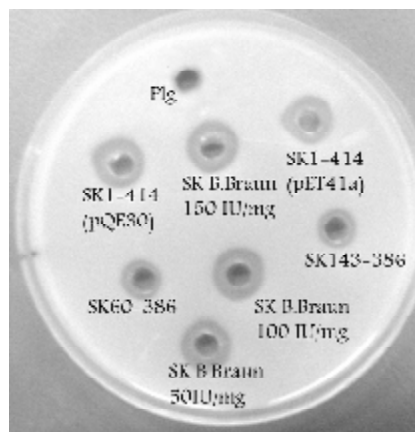
دارد (جدول 2). از طرف دیگر استرپتوکینازهای کوتاه شده SK60-386 و SK143-386 در مقایسه با SK1-414 حاصل از سازه pQESK1-414 در هر میکروگرم به ترتیب حدود 85 و 90 درصد کاهش فعالیت داشتند. اما، فعالیت آن ها در مقایسه با SK1-414 حاصل از سازه pETSK1-414 در هر میکرومول به ترتیب حدود 83 و 91 درصد کاهش داشت (جدول 2).

برای تعیین فعالیت زیستی پروتئین های نوترکیب ساخته شده در این مطالعه استفاده شد. نتایج نشان می دهد که فعالیت پروتئین کامل بدست آمده از سازه pETSK1-414 نسبت به پروتئین کامل بدست آمده از سازه pQESK1-414 بر حسب میزان واحد بین المللی در هر میکروگرم حدود 18 درصد کاهش، اما بر حسب میزان واحد بین المللی در هر میکرومول حدود 30 درصد افزایش فعالیت



شکل 2- الف) ژل پلی اکریل آمید مربوط به الکتروفورز عصاره سلولی کلون های بیان کننده ژن های کوتاه شده و کامل استرپتوکیناز؛ ستون 1، الگوی وزن پروتئینی؛ ستون 2 تا 7 به ترتیب نمونه های القا شده و القا نشده SK1-414، SK60-386 و SK143-386؛ ب) باندهای پروتئینی استرپتوکیناز تخلیص شده؛ ستون 1، الگوی وزن پروتئینی؛ ستون 2 تا 4 به ترتیب SK60-، SK1-414 و SK143-386؛ ج) وسترن بلات باندهای پروتئینی استرپتوکیناز؛ به ترتیب از سمت چپ SK1-414 حاصل از pQE30، الگوی وزن پروتئینی، SK143-386، SK60-386 و SK1-414.

Figure 2- analysis of proteins; A) SDS-PAGE analysis of crude extracts related to truncated and full-length SK; lane1, protein weight marker; lane2 to 7 induced and uninduced samples of SK1-414, SK60-386 and SK143-386, respectively; B) purified SK proteins; lane1, protein weight marker; lane2 to 4, SK1-414, SK60-386 and SK143-386, respectively; C) western blot analysis of SK proteins; lane1, Sk1-414 from pQE30; lane2, unstained protein weigh marker; lane3 to 5, SK143-386, SK60-386 and SK1-414 respectively.



شکل 3- ارزیابی فعالیت پروتئین های استرپتوکیناز نو ترکیب به روش کازئینولیز. از پلاسمینوژن (Plg) به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

Figure 3- Evaluation of recombinant SK proteins by Caseinolysis method; plasminogen was used as negative control.

جدول 2- مقایسه فعالیت اختصاصی استرپتوکیناز های کوتاه شده با استرپتوکیناز کامل بیان شده در دو وکتور pET41a و pQE30.

SK143-386 (pET41a)	SK60-386 (pET41a)	SK1-414 (pET41a)	SK1-414 (pQE30)	
1443	2186	11743	14326	فعالیت اختصاصی
				Specific activity (IU/mg)
10	15	82	*100	درصد
				Percent
88	157	952	669	فعالیت اختصاصی
				Specific activity (IU/ μ Mol)
9	17	**100	70	درصد
				Percent

* فعالیت SK1-414 (IU/mg) حاصل از سازه pQESK1-414 100 در صد در نظر گرفته شده و میزان فعالیت بقیه نسبت به آن محاسبه شده اند. ** فعالیت SK1-414 (IU/ μ M) حاصل از سازه pETSK1-414 100 در صد در نظر گرفته شده و میزان فعالیت بقیه نسبت به آن محاسبه شده اند.

Table 2- Comparison of specific activity of truncated and full-length SK expressed in pQE30 and pET41a vectors.

*Activity (IU/mg) of SK1-414 from pQE1-414 considered as 100 percent and the activity of others calculated accordingly. ** Activity (IU/MOL) of SK1-414 from pQESK1-414 considered as 100 percent and the activity of others calculated accordingly.

بحث

ایجاد ساختار های ثانویه در ناحیه ترجمه و اثر مهارتی آنها بر حرکت ریبوزوم ها در این رابطه مطرح می باشد (Anonymous 2003). برای بهبود شرایط بیان از وکتور pET41a استفاده شد که بعد از کدون شروع و قبل از جایگاه چندگانه کلونینگ (MCS) آن سه برچسب GST-tag، His-tag و S-tag قرار دارد (شکل 1). احتمالاً بیان این برچسب ها قبل از پروتئین های کوتاه شده از ایجاد ساختار های ثانویه در شروع ترجمه جلوگیری کرده و باعث بیان مناسب آن ها شدند.

در بررسی های اولیه فعالیت زیستی پروتئین های کوتاه شده و کامل با استفاده از روش کازئینولیز مشخص گردید که همه پروتئین ها، با وجود سه برچسب اضافی، که باعث افزایش 32 کیلودالتون در وزن پروتئین ها می شد، فعال بودند. همچنین استفاده از اوره 8 مولار در فرایند تخلیص با ستون جذبی Ni-NTA agarose، که یک دناتور کننده قوی برای پروتئین ها می باشد، مانع از فعالیت انواع مختلف استرپتوکیناز نگردید، بطوری که پروتئین های کوتاه شده و کامل (حاصل از سازه pQESK414 و pETSK414) در روش کازئینولیز، فعالیت قابل توجهی نسبت به استرپتوکیناز استاندارد داشتند (شکل 3). به این ترتیب این یافته به خوبی نشان داد که استرپتوکیناز یک پروتئین بسیار انعطاف پذیر در

مطالعات فراوانی روی استرپتوکیناز و داروهای ترومبولیتیک دیگر در جهت افزایش اختصاصیت آن ها به فیرین انجام شده است (Reed et al., 1999; Banerjee et al., 2004; Wong et al.; Sazonova et al., 2004). مطالعات نشان می دهند که حذف 59 اسید آمینه انتهای آمینی باعث می شود که استرپتوکیناز تبدیل به یک پروتئین اختصاصی نسبت به فیرین شود (Reed et al., 1999; Sazonova et al., 2004). از طرفی همانطور که قبلاً اشاره گردید گزارش شده است که ناحیه 387-414 تاثیری در فعالیت استرپتوکیناز ندارد. به همین منظور در این تحقیق سعی بر تولید پروتئین های کوتاه شده SK60-386 و SK143-386 به صورت نوترکیب گردید تا امکان دستیابی به پروتئین استرپتوکیناز با اثرات آلرژیک و نیز عوارض هموراژیک کمتر فراهم گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که مولکول های کوتاه شده استرپتوکیناز در وکتور pQE30، علی رغم استفاده از غلظت های مختلف IPTG بیان نشده و یا به مقدار بسیار ناچیزی بیان شده به طوری که قابل ردیابی نبودند. به طور کلی، بیان مولکول های کوتاه شده مشکل می باشد (Reed et al., 1999; Sazonova et al., 2004). در حالی که دلیل این موضوع کاملاً مشخص نشده است، احتمال

می گردد. از طرفی، با مقایسه SK60-414 و SK1-414 نشان داده شد که در حضور فیبرین کاهش فعالیتی که در روش کروموزنیک دیده می شود وجود نخواهد داشت (Reed et al., 1999؛ Sazonova et al., 2004). بنابراین، انتظار می رود که فعالیت پروتئین های SK60-386 و SK143-386 حاصل از این تحقیق نیز در حضور فیبرین افزایش داشته باشد که در مطالعات بعدی به این موضوع و مقایسه خواص آنتی ژنیک پروتئین های کوتاه شده و کامل پرداخته خواهد شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که بر اساس طراحی صورت گرفته پروتئین های کوتاه شده استرپتوکیناز (SK60-386 و SK143-386) در پلاسمید pET41a به خوبی کلون و بیان شده و به واسطه اتصال برچسب هیستیدینی به راحتی قابل تخلیص می باشند. همچنین همانطور که انتظار می رفت، در روش کروموزنیک این پروتئین ها نسبت به پروتئین کامل افت فعالیت بیولوژیک را نشان دادند. به دنبال این پژوهش، مطالعات در راستای بررسی فعالیت پروتئین های کوتاه شده مذکور در حضور رشته های فیبرین و نیز تاثیر حذف قطعات 59-1، 142-1 و 386-414 بر کاهش آنتی ژنیسیته پروتئین در دست انجام است.

برابر تغییرات ساختمانی و همچنین شرایط محیطی می باشد.

ارزیابی فعالیت به روش کمی کروموزنیک نشان داد که استرپتوکیناز کامل دارای سه برچسب (به دست آمده از وکتور pETSK414)، نسبت به استرپتوکیناز دارای یک برچسب (به دست آمده از pQESK414)، به ازای هر میکروگرم فعالیت کمتری دارد. در حالی که، به ازای هر مول فعالیت بیشتری را نشان می دهد (جدول 2). این تفاوت احتمالاً به دلیل بزرگتر بودن پروتئین GST.His(6).S.SK (79 کیلو دالتون) نسبت به پروتئین (His)6.SK (47 کیلو دالتون) می باشد، یعنی به نسبت افزایش وزن که حاصل از برچسب های اضافی هستند، فعالیت بیشتری مشاهده نشد که این منطقی به نظر می رسد. اما، پروتئین های کوتاه شده SK60-386 و SK143-386 نسبت به SK1-414 حاصل از pQESK414 به ازای هر میکروگرم به ترتیب کاهش فعالیت 85 و 90 درصدی داشتند (جدول 2). همچنین این پروتئین ها به ازای هر میکرومول به ترتیب کاهش 83 و 91 درصدی داشتند (جدول 2). این یافته ها در تائید مطالعات قبلی (Reed et al., 1999؛ Sazonova et al., 2004) نشان می دهد که حذف 59 و 142 اسید آمینه ابتدایی، باعث کاهش شدید فعالیت در روش کروموزنیک

منابع

- Anonymous (2003). A Handbook For High-Level Expression and Purification of 6xHis-Tagged Proteins; QIA Expressionist, Fifth Edition, 48-62.
- Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC (2004). Streptokinase, a Clinically Useful Thrombolytic Agent. *Biotechnology Advances* 22: 287–307.
- Baruah DB, Dash R N, Chaundhari MR and Kadam SS (2004). Plasminogen Activators: A Comparison. *Vascular Pharmacology* 44: 1-9.
- Coffey JA, Jennings KR, Dalton H (2001). New Antigenic Regions of Streptokinase are identified by Affinity Directed Mass Spectrometry. *European Journal of Biochemistry* 268: 5215-5221.
- Nihalani D, Kumar M, Rajgopal K, Sahni G (1998). Role of the Amino-terminal Region of Streptokinase in the Generation of a Fully Functional Plasminogen Activator Complex Probed with Synthetic Peptides. *Protein Science* 7: 637-648.
- Panizzi P, Boxrud PD, Verhamme IM, Bock PE (2006). Binding of the COOH-terminal Lysine Residue of Streptokinase to Plasminogen Kringles Enhances Formation of the Streptokinase-Plasmin(ogen) Catalytic Complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 26774–26778.
- Reed GL, Lin AF, Parhami-Seren B, Kussie P (1995). Identification of a Plasminogen Binding Region in Streptokinase That Is Necessary for the Creation of a Functional Streptokinase-Plasminogen Activator Complex. *Biochemistry* 34: 10266-10271.
- Reed GL, Parhami-seren B, Wang S, Hedstrom L (1999). A Catalytic Switch and the Conversion of Streptokinase to a Fibrin Targeted Plasminogen Activator. *PANAS* 96: 8879-8883.
- Roohvand F (1998). PCR-Based Isolation, Cloning and Expression of Streptokinase Gene from a Group of *Streptococcus Equimilis* in *E.coli*. A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the Middle East technical university in partial fulfillment of the requirement for the degree of doctoral of philosophy in the department of biotechnology.
- Sazonova IY, Robinson BR, Gladysheva IP, Castellino FJ, Reed GL (2004). Alpha Domain Deletion Converts Streptokinase into a Fibrin-dependent Plasminogen Activator through Mechanisms Akin to Staphylokinase and Tissue Plasminogen Activator. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24994-5001.
- Wong SL, Nathoo S (1994). Engineering and Production of Streptokinase in a *Bacillus subtilis* Expression-Secretion System. *Applied and Environmental Microbiology*: 517-523.
- Wu D, Chuang W, Hsu J, Young K, Chang C, Wu H (2001). Coiled Coil Region of Streptokinase γ -Domain Is Essential for Plasminogen Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 15025–15033.

Cloning and expression of truncated and intact streptokinase molecules in *E.coli* and evaluation of their biological activities

Arabi R.¹, Roohvand F.^{*2}, Noruzian², Aghasadeghi M.R.², Memarnejadian A.², Khanahmad H.², Sadat M.³, Motevali F.³

¹ PhD student, Pasteur Institute of Iran, Tehran

² Academic member, Pasteur Institute of Iran, Tehran

³ MSc, Pasteur Institute of Iran, Tehran

Abstract

Streptokinase is the most utilized drug for thrombolytic therapy. However, due to its nonhuman origin and nonspecific activity in the absence of fibrin, its application may encounter side effects such as allergic reactions and hemorrhage respectively. It is suggested that some truncated forms of streptokinase may show better fibrin-specificity and decreased antigenicity while retaining most of the enzymatic activity. In the present study, different truncated forms of streptokinase gene, "Skc60-386 and skc143-386" together with the intact form of *skc* (*skc1-414*) were cloned in T5 and T7 based-*E.coli* expression vectors, "pQE30 and pET41a" respectively. While expression of intact streptokinase could equally be achieved in both systems, but pET41a was the only effective system to produce truncated forms. pET41a vector contains three tandem tags before multiple cloning sites which possibly prevent intrinsic problems encountered in heterologous recombinant protein expression in *E.coli*. Analyses of the purified proteins by SDS-PAGE and Western blotting evidenced for the true expression and the expected MWs. While caseinolysis method was not able to demonstrate exact difference between specific activity of SK143-386, SK60-386 and SK1-414 but truncated molecules showed high reduction of specific activity (83 to 91 percent) compared to the full-length streptokinase by more exact techniques such as colorimetric assay. This study provided a primary comparative study for expression of streptokinase and its truncated forms and analyses of their specific activity. Thus further analyses would determine their specificity to fibrin and antigenicity.

Key words: *streptokinase, truncated proteins, cloning, biological activity*

* Corresponding author: F. Roohvand

Telefax: 02166969291

Email: rfarzin@pasteur.ac.ir