

Improvement of recombinant streptokinase production in *E.coli*

Molaei N¹, Abtahi H^{2*}

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran
2- Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received 1 May 2011, Accepted 29 June 2011

Abstract

Background: Streptokinase is one of the antigenic proteins secreted by streptococcus pyogenes. This protein has an important role in bacterial pathogenesis. The aim of this study was to produce recombinant forms of this enzyme so that the product would change in accordance with changes in the media.

Materials and Methods: In this experimental study, we amplified the streptokinase gene by polymerase chain reaction (PCR) method. After extraction, it was sub-cloned to prokaryotic expression vector pET32a. pET32a-Ska was transferred to E.coli BL21-DE3-plySs strain. Protein production was induced by IPTG and optimization of culture media and OD of bacteria. The recombinant protein was extracted by Ni-NTA and its concentration was measured by Bradford assay. Western- Blot analysis was used to verify the recombinant protein.

Results: The nucleotide sequence of the amplified gene was the same as streptokinase gene of the streptococcus pyogenes. The production of recombinant streptokinase by induction of plasmid pET32a-Ska was done by IPTG. The recombinant streptokinase had the same antigenic properties as natural streptokinase. The largest amount of recombinant protein was produced in bacteria concentrations with OD = 0.8. Also, the production of the recombinant protein was higher in media with no glucose.

Conclusion: Changes in culture media can increase the production of recombinant proteins in host bacteria. The presence of nutrients, such as glucose, alone not only can not increase the amount of production but it might even decrease it.

Keywords: Gene Expression, Group A Streptococcus, Streptokinase

*Corresponding author:

Address: Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

بهینه سازی تولید آنزیم استرپتوکیناز نو ترکیب در باکتری اشريشا کلی

ندا مولایی¹، حمید ابطحی^{2*}1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
2- استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/2/11، تاریخ پذیرش: 90/4/8

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکیناز از جمله پروتئین های ترشحی استرپتوکوک پیوژن است. این پروتئین در بیماریزایی باکتری نقش مهمی دارد. در این تحقیق سعی بر تولید بالای این آنزیم به شکل نو ترکیب بوده به طوری که محصول با تغییر ترکیب محیط کشت و تعداد باکتری القاء شده افزایش یابد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، با استفاده از روش PCR، ژن استرپتوکیناز از استرپتوکوک پیوژن تکثیر گردید. پس از تخلیص، ژن در ناقل پلاسمیدی pET32a جهت بیان کلون گردید. سپس ساختار پلاسمیدی pET32a-Ska- وارد باکتری اشريشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القاء توسط IPTG و بهینه سازی شرایط محیط کشت و تعداد باکتری ها صورت گرفت. پروتئین نو ترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نو ترکیب انجام شد.

یافته ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده با ژن استرپتوکیناز باکتری استرپتوکوک پیوژن یکسان بود. تولید پروتئین نو ترکیب استرپتوکیناز با القاء پلاسمید pET32a-Ska- توسط IPTG انجام گردید. پروتئین تولید شده از نظر آنتی ژنیسیته با فرم طبیعی یکسان بود. بیشترین مقدار پروتئین تولید شده در غلظت باکتری با جذب نوری 0/8 بود. در محیط فاقد گلوکز نسبت به محیط های گلوکز دار پروتئین بیشتری تولید شد.

نتیجه گیری: تغییر شرایط محیط کشت می تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین های نو ترکیب در باکتری میزبان گردد. وجود برخی عوامل غذایی از جمله گلوکز به تنهایی باعث افزایش محصول نمی شود بلکه امکان دارد کاهش محصول را نیز در پی داشته باشد.

واژگان کلیدی: استرپتوکوک گروه A، استرپتوکیناز، بیان ژن

* نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

مقدمه

استرپتوکوک های متعلق به گروه A لانسفیلد عامل بسیاری از عفونت های چرکی در انسان می باشند. مهمترین عفونت های ناشی از این باکتری ها در انسان شامل سلولیت، لنفانژیت، گلو درد چرکی، باد سرخ، زرد زخم و غیره می باشند (1). علاوه بر آن، این باکتری ها باعث بروز عوارض دیررس غیر چرکی در انسان می شوند. تب روماتیسمی و گلومرولونفریت دو عارضه مهم ناشی از بروز عفونت استرپتوکوک های گروه A در انسان هستند (2). استرپتوکیناز یک پروتئین آنزیمی خارج سلولی می باشد که توسط سویه های مختلف استرپتوکوک های بتا همولیتیک ساخته می شود ترشح این آنزیم نقش مهمی در بیماری زایی و تهاجم باکتری در میزبان دارد. این آنزیم توسط اکثر سویه های گروه A و C ترشح می گردد (3). استرپتوکیناز A پروتئینی تک رشته ای با وزن مولکولی 46 کیلو دالتون می باشد که توالی آمینواسیدی آن مشابه آمینواسیدهای گروه C است و 85 درصد این توالی آمینو اسیدی بین گروه A و C مشابه است (4). مطالعات نشان می دهد که هتروژنیتی قابل توجهی بین استرپتوکینازهای تولید شده از گروه های مختلف استرپتوکوک وجود دارد (5). این آنزیم دارای قدرت آنتی ژنی بوده و در عفونت های ناشی از استرپتوکوک های گروه A تیتراژ آنتی بادی بر علیه آن افزایش می یابد بنابراین می توان از این پروتئین برای تشخیص سرولوژیک عفونت های استرپتوکوکی استفاده کرد. در حال حاضر برای تشخیص بیماران مبتلا به عفونت های استرپتوکوکی گروه A از آزمایش آنتی استرپتولایزین (Anti Streptolysin O- ASO) و استرپتولایزین O (Streptolysin O) استفاده می شود (6). معایب استفاده از این آنزیم در تشخیص مبتلایان به عفونت های ناشی از این باکتری حساسیت به اکسیژن و غیر فعال شدن آن در برابر کلسترول سرم می باشد. در حضور کلسترول آزاد به خصوص در افرادی که کلسترول خون بالا دارند، استرپتولایزین O جذب کلسترول شده در نتیجه باعث نتایج مثبت کاذب و یا گزارش تیتراژ آنتی بادی بالاتر می شود. علاوه بر آن در عفونت های جلدی ناشی از استرپتوکوک پیوژن ارزیابی آنتی استرپتولایزین O ارزش چندانی ندارد (7). لذا با توجه به وجود قدرت آنتی ژنی استرپتوکیناز و در نتیجه تحریک تولید آنتی

بادی در طی بروز عفونت استرپتوکوکی، می توان با ارزیابی تیتراژ آنتی بادی ضد باکتری روند بیماری ناشی از این باکتری ها را بررسی نمود. بازدهی کم تولید و بیماری زایی استرپتوکوک ها دو دلیل عمده گرایش به سمت تولید این پروتئین به صورت نوترکیب می باشد (8). با استفاده از استخراج ژن استرپتوکیناز از استرپتوکوک گروه A، کلون کردن و بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب در پلاسמידهای بیانی می توان مقادیر بالایی استرپتوکیناز نوترکیب را به دست آورد و از آن به منظور کاربرد های تشخیصی و درمانی استفاده کرد. در این تحقیق سعی بر تولید این آنزیم به صورت نوترکیب و افزایش میزان تولید با تغییر شرایط محیط کشت شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی از باکتری های استرپتوکوک پیوژن (شرکت Mast)، اشیشیا کلی سویه DH5 α و اشیشیا کلی سویه BL21- DE3-plySs (شرکت Invitrogen) استفاده شد. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه، از پلاسמיד pTZ57R/T (شرکت fermentas) و جهت تولید استرپتوکیناز A از پلاسמיד pET32a (شرکت Novagene) استفاده شد. مواد شیمیایی استفاده شده در این طرح از شرکت مرک (Merck) و آنتی بادی ها از شرکت داکو (Dako) تهیه گردید. تخلیص کروموزوم استرپتوکوک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکوک پیوژن در محیط BHIB (Brain Heart Infusion Broth) در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS و آنزیم پروتئیناز k لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl استخراج گردید. پروتئین و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل، کلروفرم، ایزوامیل الکل به نسبت 25/24/1 و سانتریفیوژ 13000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه حذف گردید.

با استفاده از ترادف استاندارد ژن استرپتوکیناز A، طراحی

پرایمر به صورت زیر انجام شد:

آوری شد. برای بررسی پروتئین های حاصل از رسوب باکتری از ژل 10 در صد SDS-PAGE استفاده گردید.

جدول 1. برنامه زمانی و دمایی PCR بر روی ژنوم استرپتوکوک

مرحله	دما	زمان	تعداد
	(درجه سانتی گراد)	(دقیقه)	چرخه ها
جدا شدن 2 رشته DNA	95	5	1
دنا توره شدن DNA	95	1	
اتصال پرایمرها	50	1	30
تکثیر DNA	72	1	
تکثیر نهایی	72	5	1

جدول شماره 2. ترکیب محیط کشت الفاء

محتوای محیط (گرم)	محیط 1	محیط 2
عصاره مخمر	0/25	0/25
تریپتون	0/5	0/5
گلوکز	0/05	-
Nacl	0/25	0/25
Kcl	0/025	0/025
Mgcl2	0/013	0/013
Cacl2	0/013	0/013
نوترینت برات	0/019	0/019
Cacl2	0/013	0/013
حجم نهایی	25 میلی لیتر	25 میلی لیتر

تخلیص پروتئین با کیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیژن) انجام گرفت. جداسازی پروتئین های دارای دنباله 6 اسید آمینه هیستیدین با استفاده از تکنولوژی Ni-NTA بر اساس کروماتوگرافی تمایلی انجام گردید. نیتروتری استیک اسید (Nitrilo) (Triacetic Acid) دارای 2 جایگاه آزاد برای میان کنش با 6 his-tag می باشد. NTA به یون های فلزی مانند Ni²⁺ با پایداری بالایی متصل شده و شرایط سخت شستشو نیز موجب جدا شدن یونها از آن نمی گردد.

برای تخلیص پروتئین ها معمولاً از Ni-NTA آگارز استفاده می گردد. Ni-NTA آگارز از اتصال Ni-NTA با سفاروز CL-6B ساخته شده است و ظرفیت اتصال بالایی را با توالی اسید آمینه متشکل از شش اسید آمینه هیستیدین (6his-tag) دارد. برای تایید صحت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی ژنیک آن از آزمون وسترن

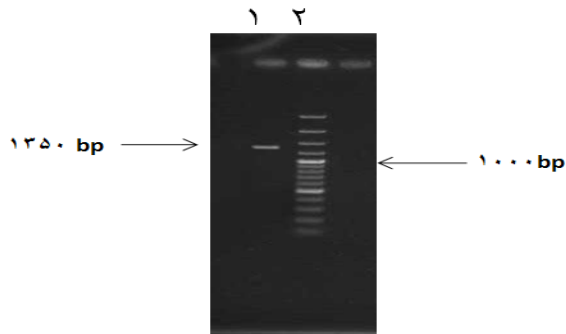
Forward: GGGATCCATGAAAAATTACTTATCT

Reverse: ACTCGAGTTATTTGTCTTTAGGGT

پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI می باشد (ترادف آنزیم ها با زیر خط مشخص شده اند). تکثیر ژن استرپتوکیناز A با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم 50 میکرولیتر انجام شد. برنامه PCR استفاده شده در جدول 1 آورده شده است. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت ROCHE بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. برای کلون سازی ژن SKa پلاسمید pTZ57R/T و pET32a به این ترتیب عمل گردید که ابتدا محصول PCR با آنزیم BamHI و XhoI برش داده شد و سپس در ناقلمین مورد نظر که با همان آنزیم برش داده شده بود وارد شد. عمل اتصال ژن SKa در این پلاسمید ها با استفاده از آنزیم T4DNA Ligase در حرارت 16 درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز انجام گرفت. پلاسمید pTZ57R/T-SKa و pET32a-SKa به ترتیب در سلول های مستعد اشیریشیا کلی سویه DH5 α و سویه BL21-DE3-plySs وارد گردید. برای تایید صحت ترادف نوکلئوتیدی ژن به دست آمده از محصول PCR، ساختار پلاسمیدی pTZ57R/T-SKa به باکتری اشیریشیا کلی سویه DH5 α وارد گردید. پس از آن جهت تعیین ترادف به شرکت MWG ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی به روش سنگر تعیین گردید. برای تولید پروتئین SKa در باکتری اشیریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمید pET32a-SKa از محیط های کشت با ترکیب مشخص شده در جدول شماره 2 استفاده گردید.

سپس القا تولید پروتئین توسط Isopropyl- β -D-thio-IPTG galactoside در هر دو محیط انجام گرفت. محلول 1 مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی مولار برسد. IPTG در غلظت های مختلفی از باکتری ها به ترتیب جذب نوری 0/6، 0/8 و 1 به محیط های کشت 1 و 2 اضافه گردید. چهار ساعت بعد از افزودن IPTG، رسوب باکتری با سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه جمع

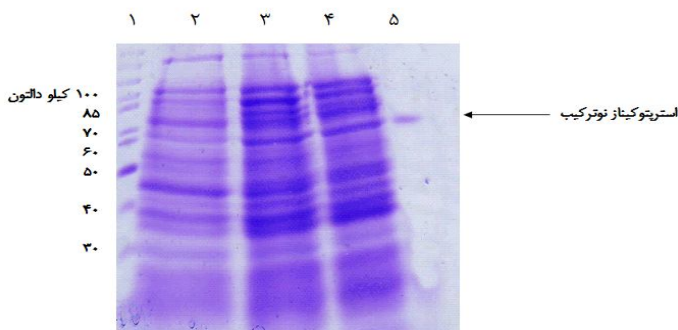
نو ترکیب استرپتوکیناز A پس از چهار ساعت از القا با IPTG در هر دو محیط تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده حدود 67 کیلو دالتون بود. نتیجه القای پروتئین استرپتوکیناز A در شکل 2 آمده است.



شکل 1. محصول PCR مربوط به ژن SKa (ستون 1) و مارکر 100bp (fermentas) (ستون 2)

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل شماره 3 نشان داده شده است و همانطور که مشاهده می شود هیچ بانندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه های سرم نرمال دیده نشد.

مقادیر پروتئین نو ترکیب تخلیص شده در طول موج 260 و 280 و جذب نوری مختلف و در شرایط وجود یا فقدان گلوکز در جدول شماره 3 آمده است.



شکل 2. القا پروتئین استرپتوکیناز در پلاسمید pET32a با استفاده از IPTG. ستون 1: پروتئین مارکر، ستون 2: نمونه قبل از القا pET32a-ska، ستون 3: نمونه بعد از القا pET32a-ska، ستون 4: پروتئین تخلیص شده

بحث

استرپتوکیناز تولید شده در این طرح تحقیقاتی از نظر آنتی ژنیسته مشابه فرم طبیعی آن بود. میزان تولید این پروتئین نو ترکیب در

بلات استفاده شد. برای این منظور موش قبلا با عصاره کشت استرپتوکک گروه A ایمونیزه شد (تزریق اول از ادجوانت کامل و به فاصله 2 هفته ادجوانت ناقص استفاده شد).

پس از بالا رفتن تیتراژ آنتی بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه گردید. برای انجام وسترن بلات پس از الکتروفورز پروتئین های حاصل از رسوب باکتری های القا یافته بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ نیتروسولوز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار گلیسین و 20 درصد متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ نیتروسولوز با قرار دادن کاغذ در محلول 2/5 درصد آلبومین سرم گاوی به مدت 1 ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ نیتروسولوز به مدت یک ساعت در مجاورت سرم موش تلقیح شده با عصاره کشت استرپتوکک گروه A و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد و پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه های سرم نوارهای کاغذ نیتروسولوزی سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار pH=8/5، 0/02 Tris، 0/05 Tween20 درصد) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت 1/2500 انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه ها با بافر TBS-T برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی ژن با آنتی بادی در کاغذ نیتروسولوز، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت (9).

یافته ها

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکک پیوژن برابر 250 میکروگرم در میلی لیتر برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن استرپتوکیناز A استفاده گردید، اندازه قطعه ژن تکثیر شده توسط PCR در مقایسه با مارکر 100 جفت بازی حدود 1350 جفت باز بود (شکل 1).

مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTZ57R/T کلون گردیده بود با ترادف ارائه شده برای ژن استرپتوکیناز A که در بانک ژن ثبت شده است یکسان بود. پروتئین

تفاوت تعداد باکتری‌ها در ابتدای القاء پروتئین، دو فاکتور مورد بررسی در این تحقیق بود. نتایج نشان می‌دهد که افزودن قند گلوکز نه تنها باعث افزایش تولید پروتئین نمی‌شود بلکه نسبت به محیط فاقد این قند، مقدار پروتئین کمتری نیز تولید می‌شود. علت این امر را می‌توان در افزایش تولید cAMP در فقدان گلوکز دانست، در نتیجه مقادیر بیشتری از کمپلکس CAP/cAMP تشکیل و باعث افزایش رونویسی از پروتئین خواهد شد. از طرفی افزودن گلوکز در محیط باعث افزایش متابولیت‌های ناشی از استفاده این قند خواهد شد که این متابولیت‌ها باعث کاهش اسیدیته محیط شده و در نتیجه سلول باکتری‌ها سریع‌تر به مرحله سکون خواهند رسید (9، 10).

جدول شماره 3. مقدار پروتئین تولید شده در جذب نوری مختلف و در حضور و یا فقدان حضور گلوکز (بر حسب میلی گرم در میلی لیتر)

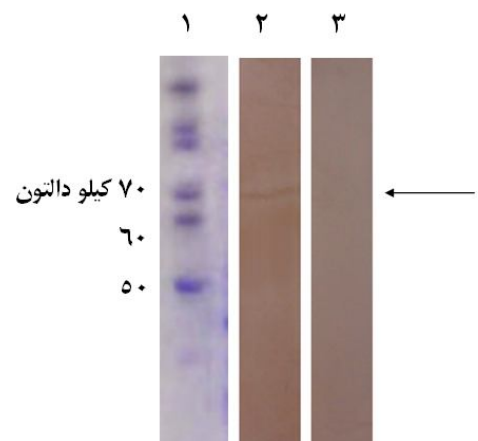
جذب نوری طول موج 260/280	0/6	0/8	1
باگلوکز	1/35	2	2/45
بدون گلوکز	1/35	3/2	3

همان‌طور که در نتایج این تحقیق دیده می‌شود، تعداد باکتری‌ها نیز می‌تواند در میزان بیان پروتئین نقش مهمی داشته باشد. با افزایش تعداد باکتری‌ها از غلظت 0/6 تا 0/8 در ابتدای القاء، مقدار تولید پروتئین افزایش می‌یابد ولی روند تولید پروتئین در جذب نوری آ، رو به کاهش است. علت این موضوع را باید در ورود باکتری‌ها به سمت مرحله سکون دانست. استرپتوکیناز تولید شده در این طرح دارای وزنی در حدود 67 کیلو دالتون است. به عبارت دیگر با استرپتوکیناز طبیعی که دارای 46 کیلو دالتون وزن است در ژل آکریل آمید اختلاف وزن دارند. علت این امر به واسطه افزودن پروتئین‌های الحاقی ناقل پلاسمیدی (pET32a) به پروتئین نوترکیب تولید شده (در حدود 20 کیلو دالتون) می‌باشد. این قطعات اضافه شده هر کدام دارای نقش مشخصی از جمله جدا سازی پروتئین را دارند. بنابراین وزن استرپتوکیناز تولید شده حدود 67 کیلو دالتون دیده شد.

نتیجه آزمون وسترن بلات نشان دهنده ساختار مشابه بین پروتئین نوترکیب تولید شده با فرم طبیعی آن است. با توجه به تشابه

غلظت‌های مختلف باکتری‌های القا شده و در دو محیط مورد مطالعه نشان داد که تولید پروتئین با تراکم باکتری 0/8 و در فقدان گلوکز بیشترین مقدار است. پروتئین نوترکیب تولید شده دارای وزن حدود 67 کیلو دالتون بود.

سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی می‌باشد. در این سیستم ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بوده و در ژنوم میزبان (سویه BL21-pLysS اشریشیاکلی) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمراز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام پذیرفت. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و در نهایت تولید پروتئین در این سیستم متأثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی‌باشد. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که رونویسی وابسته به پلیمرازهای سلول میزبان است.



شکل 3. آزمون ایمونوبلات با سرم مارکر پروتئین (ستون 1)، موش تلقیح شده با استرپتوکیناز A (ستون 2)، موش طبیعی (ستون 3)

در این مطالعه میزان پروتئین تا حدود 3/2 میلی گرم در میلی لیتر بر آورد شد (10). با بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب در این سیستم پلاسمیدی می‌توان مقادیر بالاتری از محصول را به دست آورد. در این مطالعه دو مورد برای بهینه سازی تولید پروتئین تحت آزمایش قرار گرفت. افزودن گلوکز به عنوان یک منبع انرژی و

منابع

1. Murray PR, Rosenthal SK, Kobayashi SG, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 217-232.
2. Borriello SP, Murray PR, Funke G, Topley W, Wilson G. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacteriology. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005. p. 833.
3. Kunamneni A, Abdelghani TTA, Ellaiah P. Streptokinase—the drug of choice for thrombolytic therapy. Journal of thrombosis and thrombolysis. 2007;23(1):9-23.
4. Huang TT, Malke H, Ferretti J. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in Escherichia coli, and sequence analysis. Molecular microbiology. 1989;3(2):197-205.
5. Jackson KW, Tang J. Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. Biochemistry. 1982;21(26):6620-5.
6. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A, Scott E, Bailley W. Diagnostic microbiology. 11th ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 298-314
7. Sung HY, Lim CH, Shin MJ, Kim BS, Kim YO, Song HC, et al. A case of post-streptococcal glomerulonephritis with diffuse alveolar hemorrhage. Journal of Korean medical science. 2007;22(6):1074-78.
8. Cáceres-Lóriga FM, Pérez-López H, Santos-Gracia J, Morlans-Hernández K, Marrero-Mirayaga MA. Thrombolytic treatment as first option in recurrent tricuspid prosthetic valve thrombosis and Ebstein's anomaly. J Pharm Pharm Sci. 2005;8(2):332-4.
9. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th ed. New York: CSHL press; 2001.
10. Noegel AA, Blau-Wasser R, Sultana H, Müller R, Israel L, Schleicher M, et al. The cyclase-associated protein CAP as regulator of cell polarity and cAMP signaling in Dictyostelium. Molecular biology of the cell. 2004;15(2):934-45.

آنتی ژنیک بین فرم طبیعی و نوترکیب استرپتوکیناز تولید شده در این تحقیق می توان از فرم نوترکیب این آنزیم برای تشخیص و بررسی روتین عفونت های ناشی از استرپتوکوک پیوژن استفاده نمود. با توجه به معایب تست ASO در تشخیص عفونت استرپتوکوکی به نظر می رسد طراحی کیت های تشخیصی بر پایه این استرپتوکیناز نوترکیب می تواند راه گشای تشخیص سرولوژیک این عفونت ها باشد.

نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر سکانس، با ژن استرپتوکیناز استرپتوکوک پیوژن همولوژی داشت. تولید این پروتئین با استفاده از ناقلین بدون ترادف مربوط به پروتئین الحاقی انجام شد و مقدار مناسبی پروتئین به دست آمد. افزودن گلوکز به محیط باعث کاهش میزان پروتئین خواهد شد. بیشترین مقدار پروتئین در جذب نوری برابر 0/8 به دست آمد، این پروتئین دارای خاصیت آنتی ژنیک مشابه با فرم طبیعی داشته و می توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد این پروتئین در افراد مبتلا نیز استفاده نمود. در زمینه تولید و استخراج و بهینه کردن تولید پروتئین استرپتوکیناز با روش نوترکیب در کشور مطالعات محدودی انجام شده است و ضرورت دارد به منظور بهینه کردن روش تولید استرپتوکیناز نوترکیب جهت کاربرد های درمانی و تشخیصی مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی "تولید استرپتوکیناز نوترکیب و بررسی آنتی ژنیسته آن" مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک (طرح 364) و همچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی خانم ندا مولایی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی می باشد. لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکاری های که ما را در این پژوهش همکاری کرده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.