Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، بهار، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۳۰۸۶-۳۰۷۹

کلون سازی و بیان ژن هیرودین نوترکیب در رده سلولی CHO

علی شریف زاده[1*]، میلاد حیدری[2]، فرانک عالی[2]

چکیده

هیرودین پروتئینی به طول ٦٦-٦٥ اسیدآمینه می باشد که از غدد بزاقی زالو ترشح و به عنوان یک داروی ضدانعقاد مطرح است. این دارو مهارکننده بسیار قوی ترومبین بوده و در ممانعت از ترومبوسهای عروقی موثر است. هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن هیرودین در سلول های CHO به عنوان یک سلول یوکاریوتی بود. در مطالعه حاضر، قطعه ۲۲۱ بازی ژن هیرودین در وکتور pcDNA3.1(+) کلون گردید. وکتور نوترکیب هیرودین در سلول CHO با استفاده از لیپوفکتامین ترانسفکت گردید. بیان ژن هیرودین به وسیله RT-PCR سنجش گردید. در نهایت بیان ژن هیرودین با PCR و هضم آنزیمی تایید گردید. وکتور نوترکیب در این تحقیق با موفقیت آزمون گردید. یافته های تحقیق نشان داد که بیان ژن هیرودین با موفقیت صورت گرفته است. پلاسمید نوترکیب، mRNA مربوط به هیرودین را در سلول CHO بیان کرد. بنابراین پروتئین نوترکیب تولیدی در این مطالعه می تواند در تحقیقات بعدی به عنوان یکی از روش های مکمل در امر درمان و اختلالات قلبی عروقی و انعقادی مورد توجه قرار گیرد و به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: *بیان ژن، هیرودین، کلونینگ.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۵

مقدمه

حجامت (خون گیری سطحی) فصد (خون گیری عمقی) و زالو درمانی (خون گیری نیمه عمیق) از روش های درمانی مرسوم در طب سنتی بسیاری از کشورهای دنیا می باشد (۱، ۲). در سال ۲۰۰٤ زالو درمانی توسط اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) مورد تایید قرار گرفت (۳). در بین بیش از ٦٥ گونه زالو، نژاد Hirudo Medicinalis بیش از همه استفاده می شود (٤). زالو از گذشته در طیف وسیعی از بیماریهای پوست، اختلالات سیستم اعصاب، مشکلات سیستم اداری تناسلی، التهاب و مشکلات دندان استفاده شده است (٥). امروزه از زالو برای درمان کمکی آبسه، ارتریت،گلوکوم، میاستنی گراو، ترومبوس و برخی اختلالات وریدی استفاده می شود (٦). هم چنین زالو درمانی با موفقیت برای درمان هماتوم اسکروتوم نیزاستفاده شده است (۷). پرفشاری خون، آنژین صدری، انفارکتوس میوکارد نیز از موارد دیگر می باشد که زالو درمانی برآن اثرگذار است (۸). اثربخشی بزاق زالو در بیماری های قلبی عروقی به طور عمده ناشی از وجود یک مهارکننده اختصاصی ترومبین به نام هیرودین است که اثر مهار کنندگی قوی بر ترومبین آزاد و ترومبین متصل به لخته دارد (۹). این پروتئین مهم ترین پروتئین ضد انعقاد در بزاق زالو است که خاصیت ضدانعقادی قوی تری از هپارین دارد (۱۰). هیرودین اثرات پایدار و یکنواخت وابسته به دوز داشته در انسان مسمومیت نداده و بی حسی موضعی می دهد (۱۱). هیرودین تنها ماده ضدانعقاد مشتق از حیوانات خونخوار است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای اهداف بالینی تایید شده است. هیرودین در پیشگیری از ترومبوز وریدهای عمقی و حوادث ایسکمیک در بیماران مبتلا به آنژین موثرتر از هپارین است. هیرودین برعکس مهارکننده های غیرمستقیم ترومبین (هپارین) و بدون نیاز به کوفاکتورهای اندوژن اثر بازدارندگی مستقیم بر ترومبین دارد. هم چنین این ماده داروی انتخابی در بیماران مبتلا به سندروم داخل عروقی منتشر (کمبود آنتی ترومبین) است. هیرودین به علت مسدود کردن باند ترومبین– فیبرین و ممانعت از رشد ترومبوز دارای فعالیت پیشگیری کننده در بیماران در معرض خطر ابتلا به حوادث قلبی عروقی است. هیرودین موجب کاهش ترومبوس وریدهای عمقی و آمبولی ریه و موجب

*۱- گروه آموزشی میکروبیولوژی ،دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران(sharifzadeh@iaushk.ac.ir)

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

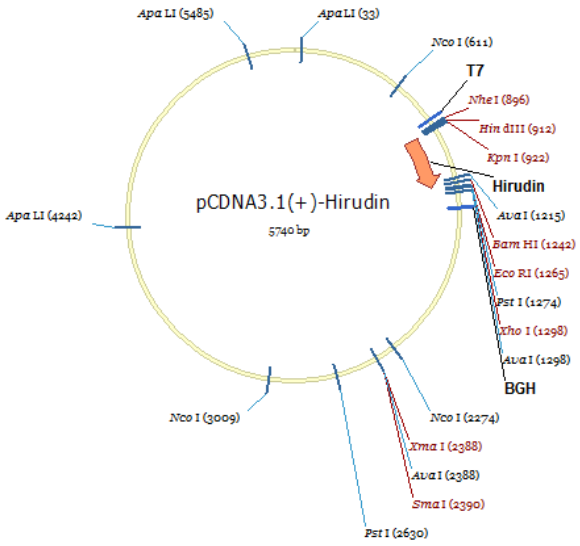
پیشگیری از گسترش ترومبوس وریدی می گردد (۱۲). داروی ضد انعقاد Piyavit که از عصاره بزاق زالو ساخته شده در بازار روسیه وجود داشته و در بیماران مبتلا به ترومبوفلبیت با اثر ضدالتهابی موجب کاهش انعقادپذیری می شود (۱۳).

فرم نوترکیب هیرودین به عنوان مهار کننده ترومبین با برند رفلودان (تولید شرکت برلکس) نیز هم اکنون در آمریکا برای بیماران دارای ترومبوسایتوپنی استفاده می شود. داروهای Lepirudin و Desirudin نیز اشکال دیگر نوترکیب هیرودین بوده که توسط FDA تایید و با نام تجاری Refludan و Iprivask در حال استفاده است (۱٤). با توجه به مزیت دارویی هیرودین و ارجحیت مصرف آن در مقایسه با سایر داروهای ضد انعقاد و عدم واردات این دارو در کشور بر اساس گزارش سالانه معاونت غذا داروی وزارت بهداشت و نداشتن رقیب ، تولید این داروی ضد انعقاد در داخل کشور ضروری به نظر می رسد. این داروی ضد انعقاد می تواند در بسیاری از بیماری های قلبی عروقی و هم چنین در عمل های جراحی به کار رفته و خطر ناشی از آمبولی یا لخته شدن خون را که به مرگ منتج می شود را کاهش دهد. هدف از انجام این تحقیق ، بررسی بیان ژن هیرودین در سلول های تخمدان هامستر چینی (CHO) بود.

مواد و روش کار

پلاسمید و سویه باکتری

پلاسمید pcDNA3.1(+) (اینویتروژن – امریکا) شاتل وکتور است که دارای قابلیت کلون کردن ژن مورد نظر درون سلول و بیان ژن در رده سلولی پستانداران را دارا می باشد. این پلاسمید به عنوان وکتور کلونینگ و بیانی و باکتری اشریشیاکلی سویهF TOP10 (سیناژن، ایران) به عنوان میزبان پروکاریوتی انتخاب شد. وکتور pcDNA3.1(+) یک وکتور بسیار پر کاربرد است که دارای قابلیت کلون کردن ژن هیرودین درون سلول و بیان ژن هیرودین درون رده سلولی پستانداران می باشد. هم چنین حاوی ژن مقاومت به نئومایسین است که به منظور غربالگری کلون های پایدار ترانسفکت شده در رده سلولی یوکاریوتی استفاده گردید. وکتور نوترکیب حاوی ژن هیرودین که به شکل pcDNA3.1(+)-Hirudin (ژن ری، چین) نوشته می شود، وکتور خالی (pcDNA3.1 فاقد ژن هدف)، هر یک به صورت جداگانه در باکتری باکتری اشریشیاکلی سویه TOP10F به روش شیمیایی (CaCl2) و با شوک حرارتی انتقال داده شدند. پس از کشت و تکثیر باکتری های ترانسفرم شده، مقادیر لازم از پلاسمید های فوق الذکر تهیه و تخلیص گردید. صحت حضور ژن هیرودین در وکتور نوترکیب با PCR و روش هضم آنزیمی با آنزیم های محدودگر KpnI/BamHI بررسی شد. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب حاوی ژن هیرودین به صورت زیر است.



نگاره ۱: تصویر شماتیک وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-Hirudin

کشت رده سلولی تخمدان هامستر چینی (CHO)

رده سلولی تخمدان هامستر از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت سلولی RPMI حاوی ۱۰٪ سرم

www.SID.ir

Archive of SID

و ۱٪ پنی سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شد (۱۵).

ایجاد رده سلولی پایدار تولیدکننده هیرودین نوترکیب

ابتدا ۳۰۰/۰۰۰ سلول CHO در پلیت های ٦ خانه ای کشت داده شده و ترانسفکت در رده سلولی مذکور با مقادیر معین وکتور pcDNA3.1(+)-Hirudin و با استفاده از محلول لیپوفکتامین صورت پذیرفت. به منظور کنترل آزمایش، وکتور pcDNA3.1(+) بدون ژن هیرودین نیز انتخاب گردید . ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن محیط کشت تازه حاوی ۸۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر نئومایسین جایگزین محیط بدون آنتی بیوتیک اول گردید. کلونی های مقاوم به نئومایسین پس از ۳-۲ هفته رشد در حضور آنتی بیوتیک ایجاد گردید (۱۵) .

استخراج RNA و سنتز cDNA

از رده سلولی فوق با استفاده از ترایزول (اینویتروژن – امریکا) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل سلول استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراجی بر روی ژل ۱٪ آگارز بررسی گردید و با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین مقدار شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific - بر اساس روش کار کیت، انجام شد.

واکنش PCR

به منظور بررسی بیان ژن هیرودین در سطح mRNA در سلول های CHO حامل پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-Hirudin ، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن هیرودین انجام شد. در واقع واکنش PCR با پرایمرهای زیر انجام شد:

Hirudin-F: 5'- TCATCAGCCTGCTCTTCCTCTTC -3'

Hirudin-R: 5'- GGTCACGCACTGGTTGTCCTTG -3'

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (در حجم ۲ میکرولیتر)، ۱۰ میکرولیتر از 2X PCR Master Mix ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما، که با افزودن آب دیونیزه به حجم نهایی ۲۰ میکروایتر رسانده شد، صورت پذیرفت. برنامه دمایی دستگاه در سیستم ترمال سایکلر شرکت اپندرف به این صورت تنظیم شد. یک مرحله دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی به صورت ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ٦٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٤۰ ثانیه و نهایتا یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه در دستگاه به اجرا در آمد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و پس از رنگ آمیزی با رنگ فلئورسان اتیدیوم بروماید با نور ماورای بنفش مشاهده شدند.

نتایج

تایید حضور ژن هیرودین در وکتور نوترکیب

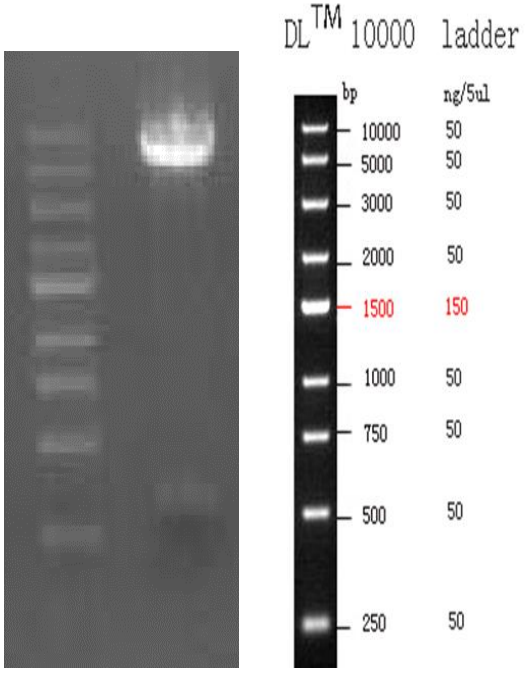
پس از ترانسفورمیشن وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-Hirudin و پلاسمید خالی pcDNA3.1(+) در میزبان پروکاریوتی (*E.Col* سویه TOP10F)، باکتری های مذکور در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاومت نشان داده و رشد نمودند که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن مرحله ترانسفورماسیون وکتورها در باکتری میزبان بود.

آزمایشات لازم برای تایید صحت وکتور نوترکیب تخلیص شده از باکتری ها، نشان دهنده حضور ژن هیرودین در این وکتور بود. نتیجه هضم آنزیمی وکتور pcDNA3.1(+)-Hirudin با دو آنزیم KpnI/BamHI موجب جدا شدن ژن هیرودین از وکتور گردید. الکتروفورز محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ نشان دهنده یک باند بزرگ در حدود ٥٤۱۰ جفت باز مربوط به وکتور و یک باند ۳۳۰ جفت بازی

www.SID.ir

Archive of SID

مربوط به ژن هیرودین بود. نتایج حاصل از هضم آنزیمی در نگاره ۲ آورده شده است.



نگاره ۲: هضم آنزیمی وکتور نوترکیبpcDNA3.1(+)-Hirudin با دو آنزیم KpnI/BamHI

بیان ژن هیرودین در سلول یوکاریوتی CHO

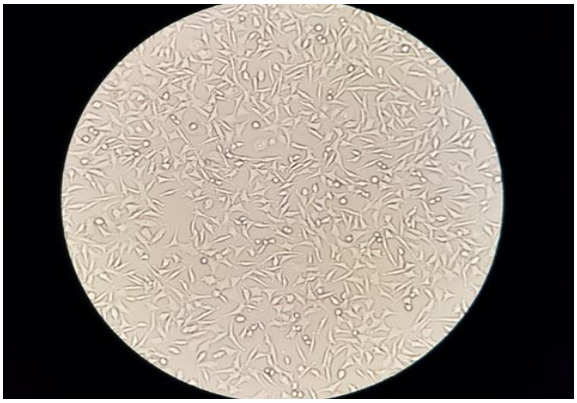
به منظور بیان ژن هیرودین، رده سلولی فوق با وکتور pcDNA3.1 حاوی ژن هیرودین، ترانسفکت گردید. پس از دو هفته کشت سلول در حضور آنتی بیوتیک نئومایسین، رده سلولی پایدار ایجاد شد. در تصویر زیر شمایی از سلول های زنده نوترکیب و مرده مشاهده می گردد (نگاره ۳).

نتیجه استخراج RNA

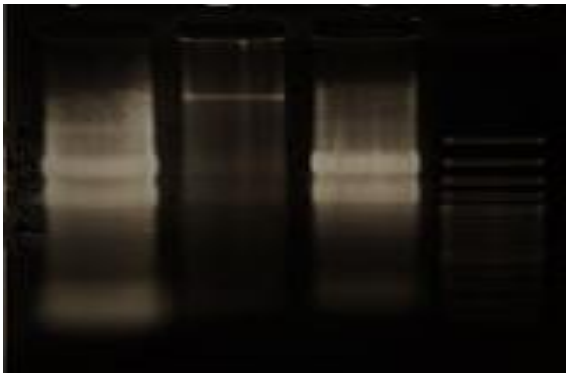
استخراج RNA از هر دو دسته سلول ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب و وکتور خالی انجام شد. نتیجه تخلیص RNA از این سلول ها در نگاره ٤ نشان داده شده است.

نتیجه بیان ژن هیرودین در سطح mRNA

پس از تخلیص RNA از سلول های ترانسفکت شده، فرایند سنتز cDNA انجام شد. سپس واکنش PCR با پرایمرهای



نگاره ۳: تصویر میکروسکوپی سلول های دریافت کننده وکتور نوترکیب



نگاره ٤: ژل الکتروفورز RNA کل سلولی روی ژل آگارز ۱٪

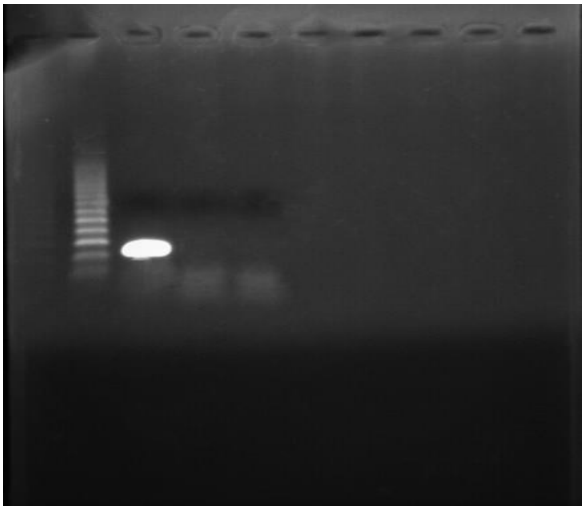
مخصوص ردیابی ژن هیرودین انجام شد. همانطور که در نگاره ۵ ملاحظه می شود، در سلول های CHO ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-Hirudin باند ۲۲۱ جفت بازی مربوط به محصول PCR ژن هیرودین دیده می شود. در صورتی که در گروه کنترل (سلول دریافت کننده وکتور خالی (pcDNA3.1(+) باند مربوط به این ژن وجود ندارد. این نتایج نشان دهنده تولید سلول های پایدار بیان کننده ژن هیرودین زالو می باشد.

بحث

هیرودین یک پلی پپتید اسیدی با وزن مولکولی حدود۹۰۰۰ دالتون می باشد که قوی ترین ممانعت کتنده طبیعی ترومبین بوده و همین دلیل استفاده از زالوی طبی در گذشته بوده است. در بسیاری از کشورها علاوه بربانک خون بانک زالو

www.SID.ir

Archive of SID



نگاره ۵: واکنش PCR برای ردیابی ژن هیرودین در سلول های CHO ترانسفکت شده

نیز وجود داشته و گونه های زالوی طبی در بسیاری از کشورها نظیر فرانسه، انگلستان، آلمان، مالزی، اوکراین و روسیه پرورش داده شده و بصورت استاندارد به بازار عرضه می شود . استخراج هیردین از زالوی طبی سبب برداشت سالانه حدود ۱۲۰۰۰ کیلو زالو در اروپا شده است. امروزه چندین شرکت دارویی با کمک باکتری و مخمر محصولاتی بر پایه هیرودین تولید می کند که این امر سبب حفظ زالوها شده است(۱۶). علیرغم نقش های متنوعی که به هیرودین نسبت داده شده است ولی نقش ضدانعقادی آن بیشتر جلوه گر است. امروزه با توجه به مزیت دارویی هیرودین و ارجحیت مصرف آن در مقایسه با هپارین به عنوان ضد انعقاد ، تولید آن در داخل کشور ضروری به نظر می رسد. از آنجا که تولید مقدار زیادی از این پروتئین از منابع طبیعی بسیار سخت و هزینه بر است، روش های تولید نوترکیب این پروتئین مد نظر قرار گرفته است. هم اکنون هیرودین نوترکیب به شکل تجاری در بازار دنیا موجود است. این پروتئین نوترکیب تولیدی در مخمرPichia Pastoris تولید و وزن مولکولی ۶۹۷۹/۵ دالتون داشته و شبیه فرم طبیعی هیرودین می باشد با این تفاوت که فاقد گروه سولفات روی تیروزین شماره ۶۳ می باشد و بنابراین تحت عنوان دسولفاتوهیرودین بیان می شود. هرچند این تغییر کوچک ساختاری باعث تمایل کمتر دسولفوهیرودین به ترومبین می شود. با این حال هیرودین نوترکیب مهارکننده بسیاراختصاصی برای ترومبین در حد پیکومولار می باشد (۱۷). در سایر تحقیقات در مخمر ساکارومیسز سرویسیه نیز این پروتئین بیان شده است (۱۸).

در سایر تحقیقات، کشت و توانایی بیان وکتورها در باکتریهایی مثل *E.Coli* ، آن ها را به میزبانان مناسبی جهت تولید مقادیر فراوانی از پروتئین های نوترکیب تبدیل نموده است(۱۹). با این حال همواره نتیجه این تحقیقات رضایت بخش نبوده است. در جریان تولید هیرودین نوترکیب در کلی باسیل، بخشی از پروتئین در ساختارهای نامحلول سیتوپلاسمی به نام گنجیدگی تجمع پیدا می کنند. محدودیت اصلی در بیان پروتئین نوترکیب در کلی باسیل در میزان بالای تجمع پروتئین ناهمگن در سیتوپلاسم است. هرچند می توان پروتئین نوترکیب موردنظر را از گنجیدگی استخراج و خالص نمود ولی هیچ تضمینی جهت دارا بودن فعالیت بیولوژیکی آن وجود نداشته و مطالعات محدود مبین عدم موفقیت در Refolding این پروتئین ها است. لازم به یادآوری است که فعالیت پروتئین بستگی به فلدینگ دقیق و صحیح ساختار سه بعدی آن دارد (۲۰). اصولا در برخی موارد تظاهر ژن های یوکاریوتی در باکتری ها (مثل ایکولای) پروتئین فعال تولید نمی نماید. به دلیل اینکه بعضی پروتئین ها قبل از اینکه فعال گردند دچار تغییرات بعد از ترجمه (فسفوریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، استیلاسیون و غیره) می شوند(۲۱). باکتری ها عموما قادر به شناسایی سیگنال های یوکاریوتی موجود بر روی پروتئین ها که نشان دهنده محل های تغییر هستند، نمی باشند و در نتیجه حتی با وجود صحیح بودن توالی اسیدهای آمینه پروتئین، یک پروتئین غیر فعال ساخته می شود(۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

به همین جهت در تحقیق فوق سعی گردید از سلول یوکاریوتی CHO به جای سلول های پروکاریوتی و از وکتورهای ترشحی برای تهیه پروتئین نوترکیب استفاده گردد. استراتژی متداول برای به دست آوردن پروتئین های فعال و محلول به کار گیری وکتورهایی است که قادر به انتقال پروتئین هدف به فضای پری پلاسمی باشد. فضای پری پلاسمی محیطی بسیارمطلوب برای شکل گیری باندهای دی سولفیدی است. مناسب بودن شرایط اکسیداسیون و احیا برای فلدینگ صحیح پروتئین هدف، کمتر بودن فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک، سهولت فرآیندهای پایین دستی، تخلیص و افزودن به فعالیت بیولوژیکی پروتئین از دیگر مزایای این محیط است که البته در تحقیقات آتی باید این مقایسه آزمایشگاهی بین محصول تولیدی دراین بستر با سایر بسترهای قبلی صورت پذیرد. نتایج موفقیت آمیز این تحقیق در خصوص تولید پروتئین نوترکیب هیرودین در CHO، می تواند نویدبخش تولید تجاری هیرودین شده، تا این پروتئین به عنوان یکی از روش های مکمل در امر درمان و اختلالات قلبی عروقی و انعقادی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر دوستی، رییس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

فهرست منابع

1. Barzegar A. Azizi A. Faridi P. Mohagheghzadeh A. Leech therapy in Iranian traditional medicine. Forsch. Komplementmed.2015. 22(1):50-53
2. Kalender M.E. Comez G. Sevinc A. Dirier A. Camci C. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. Pain. Med.2010. 11(3):443-445.
3. Brzezinski P. Solovan C. Chiriac A. Foia L. Positive outcome of medical leeches (hirudotherapy) for venous congestion. Malawi. Med. J.2015. 27(1):38-39.
4. Sobczak N. Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. Ann. Parasitol.2014. 60(2):89-92.
5. Abdualkader A.M. Ghawi A.M. Alaama M. Awang M. Merzouk A. Leech therapeutic applications. Indian J. Pharm. Sci.2013. 75(2):127-137.
6. Singh A.P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. Complement. Ther. Clin. Pract.2010. 16(4):213-215.
7. O'Dempsey T. Leeches--the good, the bad and the wiggly. Paediatr. Int. Child. Health.2012. 32(2):16-20.
8. Sawhney R. Juneja R. Rawat R.S. Mehta Y. Trehan N. Off-pump cardiac surgery (OPCAB) in a patient with recent leech therapy. Ann. Card. Anaesth.2012. 15(1):83-85.
9. Heydari M.R. Valipoor S. Leech Therapy and Cardio Vascular system . j. Cardiovas. Nurs.2016. 5(2):27-34.
10. Kumura T.Hino M.Yamane T.Tatsumi N. Hirudin as anticoagulant for both haematology and chemistry yest. J . Automated method manage in chem.2000.22(4).109-112.
11. Mergulhão F.J. Summers D.K. Monteiro G.A. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. Biotechnol. Adv.2005. 23(3):177-202.
12. Corral-Rodriguez M.A. Macedo-Ribeiro S. Pereira P.J. Fuentes-Prior P. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications. J. Med. Chem.2010. 53(10):3847-3861.
13. Cherniack E.P. Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. Altern. Med. Rev.2011. 16(1):50-58.
14. Sohn J.H. Kang H.A. Rao K.J. Kim C.H. Choi E.S. Chung B.H. Rhee S.K. Current status of the anticoagulant hirudin: it

www.SID.ir

Archive of SID

biotechnological production and clinical practice. Appl. Microbiol. Biotechnol.2001. 57(5-6):606-613.
15. Halabian R. Shagerdi Esmaili N. Oodi A. Masroori N. Amirizadeh N .Mousavi Hosseini Gharehbaghian A. Rezvan H. Jalili M Habibi Rudkenar M.Isolation,cloning and expression of recombinant human factor VII in CHO cell line.Blood .2009. 6(1): 1-11.
16. Elliott J M. Kutschera U. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation.2011.Fresh water Review. 4: 21-41.
17. Rinas U. Hoffmann F. Betiku E. Estape D. Marten S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in Escherichia coli. J. Biotechnol.2007. 127(2): 244-257.
18. Jagannadha rao K.Chul-hao K.sang-Ki R.Stastical 0ptimization of the medium for the production of recombinant hirudin from saccharomyces cervisiae using response surface methodology . process bio.200.35:639-647.
19. Sabaghzadeh S. Mirzahoseini H. Shahbazzadeh D. Naji T.Designing and Constructing Clone for Extracellular Expression of the Desirudin Anticoagulant Drug in E.coli. J Mazandaran Univ Med Sci 2014. 24(119): 72-82.
20. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol. 1999.10(5):411-421.
21. Sig A.Guney M. Guclu A.Ozmen E.Medical leech therapy-an overall perspective.int med res.2017.7:1-6.
22. Haina Q.Zhilong X.Daijia Z.Yongming B.Xiaohai L.Guozhuu H.PEYGylation of hirudin and analysis of its antithrombin activity in vitro.Chin.J.Chem.Eng. 2007. 15(4):586-590.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir