Expression of recombinant streptokinase (SKA) of group A streptococci in E. coli

N. Molaei* H. Abtahi** G.Mossayebi***

*MS.c in Cellular and Molecular Biology , Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
**Associate Professor of Microbiology, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
***Associate Professor of Immunology, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Abstract

Background: Streptokinase A is an antigenic protein secreted by Streptococcus pyogenes. This protein can be used to liquefy pus in pneumonia and the purulent joint swelling and also as an antigen for detection of group A streptococcal infections.

Objective: The purpose of this study was expression and production of recombinant streptokinase A of group A streptococci in Escherichia coli in line with diagnostic and therapeutic purposes.

Methods: Streptokinase A gene was initially amplified by polymerase chain reaction (PCR) method and sub-cloned into prokaryotic expression vector pET32a. Later, the pET32a vector was transformed into Escherichia coli BL21-DE3-plySs. Gene expression product, induced by IPTG, was purified by Ni-NTA purification kit, and measured by Bradford method. Recombinant SKA was further analyzed by Western Blot. Gene was amplified and sequenced using the Sanger method and the amplified gene in plasmid pTZ57R / T were identical to Recorded sequence in gene bank for streptokinase gene A.

Findings: The nucleotide sequence of the gene amplified by PCR was determined by Sanger method. Sequencing results showed similarity in nucleotide sequence of the cloned gene in E. coli with that of group A streptococci available in GeneBank database. The amount of protein product obtained by Bradford method was 3 mg/ml. Recombinant streptokinase protein reacted with mouse sera containing anti-streptokinase A.

Conclusion: Our data showed that expression of recombinant SKA protein is possible in Escherichia coli host. The protein product had an approximate molecular weight of 67 kDa with its antigenic properties unchanged. Thus, it can be substituted for ASO and SLO tests used in diagnosis of patients with group A streptococcal infections.

Keywords: Streptococcus Pyogenes, SKA Gene, Recombinant Gene Expression

Corresponding Address: Hamid Abtahi, Arak University of Medical Sciences, Molecular and Medicine Research Center, Arak, Iran
Email: abtahi@arakmu.ac.ir
Tel: +98-861-4173502
Received: 13 Apr 2011
Accepted: 22 Oct 2011

بیان استرپتوکیناز نوترکیب استرپتوکک گروه A در باکتری اشرشیاکلی

ندا مولایی* دکتر حمید ابطحی** دکتر قاسم مسیبی***

* کارشناس ارشد علوم سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
** دانشیار میکروب‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک
*** دانشیار ایمنی‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک

آدرس نویسنده مسؤول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه میکروب‌شناسی
تلفن ۰۸۶۱-۴۱۷۳۵۰۲ فاکس ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۲۶
Email: abtahi@arakmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۳۰

چکیده

زمینه: استرپتوکیناز A از جمله پروتئین‌های ترشحی استرپتوکک پیوژن است که قدرت آنتی‌ژنیک دارد. از این پروتئین می‌توان جهت سیال کردن چرک در ذات‌الریه و ورم مفصلی چرکی و همچنین به عنوان آنتی‌ژن برای تشخیص عفونت‌های استرپتوککی گروه A استفاده کرد.

هدف: مطالعه به منظور تولید استرپتوکیناز استرپتوکک گروه A نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی با طراحی پرایمر اختصاصی و استفاده از روش PCR، ژن استرپتوکیناز A از استرپتوکک پیوژن تکثیر و در ناقل پلاسمیدی pET32a جهت بیان کلون شد. پلاسمید pET32a-SKA وارد اشریشیاکلی سویه BL21-DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القا توسط IPTG و بهینه‌سازی شرایط انجام شد. پروتئین نوترکیب با کیت Ni-NTA خالص و مقدار پروتئین نوترکیب تولید شده با روش برادفورد اندازه‌گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تأیید پروتئین نوترکیب انجام شد. ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده با روش سنگر تعیین شد.

یافته‌ها: ترادف ژن تکثیر شده که در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده بود با ترادف ثبت شده برای ژن استرپتوکیناز A در بانک ژن، یکسان بود. مقدار پروتئین تولید شده با استفاده از روش برادفورد ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. پروتئین استرپتوکیناز نوترکیب تولید شده با سرم موش واجد آنتی استرپتوکیناز A واکنش داد. پروتئین تولید شده وزنی در حدود ۶۷ کیلو دالتون داشت و خاصیت آنتی‌ژنیک خود را به خوبی حفظ کرد.

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین نوترکیب استرپتوکیناز A در میزبان اشرشیاکلی نیز امکان‌پذیر است. بنابراین می‌توان از آن در تشخیص بیماران مبتلا به عفونت‌های استرپتوککی گروه A به جای آزمایش‌های آنتی‌استرپتولایزین O (ASO) و استرپتولایزین O (SLO) استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: استرپتوکک پیوژن، ژن استرپتوکیناز A، بیان ژن نو ترکیب

مقدمه:

استرپتوکک‌های گروه A لانسفیلد عامل بسیاری از عفونت‌های چرکی مانند سلولیت، لنفانژیت، گلو درد چرکی، باد سرخ و زرد زخم هستند.[۱] علاوه بر آن این باکتری‌ها باعث بروز عوارض دیررس غیر چرکی در انسان می‌شوند. تب روماتیسمی وگلومرولونفریت دو عارضه مهم ناشی از بروز عفونت استرپتوکک‌های گروه A در انسان هستند.[۲] اساس تشخیص عفونت‌های استرپتوککی بر دو پایه کشت (جداسازی باکتری) و آزمایش‌های سرولوژیک استوار است.

استرپتوکیناز یک پروتئین آنزیمی خارج سلولی است که توسط سویه‌های مختلف استرپتوکک‌های بتا همولیتیک ساخته می‌شود و اکثر نمونه‌های گروه A و C ،

این ماده را ترشح می‌کنند.[۳] استرپتوکیناز یک پلی پپتید تک رشته‌ای است که فعالیت فیبرینولیتیک خود را به طور غیر مستقیم با فعال کردن پلاسمینوژن در گردش خون انجام می‌دهد.[۴] استرپتوکینازهایی که توسط گروه‌های مختلف استرپتوکک ایجاد می‌شوند از لحاظ ساختمانی با هم تفاوت دارند.[۵]

استرپتوکیناز به عنوان ماده‌ای شناخته شده است که پلاسمینوژن را هم وابسته به فیبرین و هم غیر وابسته به فیبرین فعال می‌کند.[۶] مطالعه آرتور و همکاران بر روی ۲آلل استرپتوکیناز نوع A نشان داد که پروتئین استرپتوکیناز ترشح شده توسط استرپتوککوس پیوژنز از لحاظ فیبرینولیتیک سازگاری خوبی با سیستم ایمنی بدن انسان دارد بنابراین می‌تواند در طراحی نسل دوم داروهای ضد لخته (thrombolytic therapeutics) با بهبود کارایی و ایمنی به کار رود.[۷]

ایمنی‌شناسی استرپتوکیناز خیلی سریع بعد از کشف آن در دهه۱۹۳۰ شناخته شد.[۳] مطالعه‌ها نشان داده‌اند که خون بیمارانی که اخیراً با عفونت‌های استرپتوککی مواجه شده‌اند، به دلیل حضور آنتی بادی‌های خنثی‌کننده، استرپتوکیناز را غیرفعال می‌کند.[۸]

استرپتوکینازA پروتئینی تک رشته‌ای با وزن مولکولی ۴۶ کیلو دالتون است که سکانس آمینواسیدی آن با آمینواسیدهای استرپتوکیناز گروه C شباهت زیادی دارد و ۸۵ درصد سکانس بین گروه A و C مشابه است.[۹] مطالعه‌ها نشان داده‌اند که ناهمگونی قابل توجهی بین استرپتوکینازهای تولید شده از گروه‌های مختلف استرپتوکک وجود دارد.[۱۰] امروزه از استرپتوکیناز برای سیال کردن چرک در ذات‌الریه و ورم مفصلی چرکی استفاده می‌شود. در حال حاضر برای تشخیص بیماران مبتلا به عفونت‌های استرپتوککی گروه A از آزمایش‌های آنتی استرپتولایزین O (ASO) و استرپتولایزین O (SLO) استفاده می‌شود.[۱۱] از معایب استفاده از این آنزیم حساسیت آن به اکسیژن است. این ماده در اثر اکسیداسیون بی‌اثر می‌شود و همچنین حضور کلسترول آزاد به خصوص در افراد با کلسترول خون بالا باعث می‌شود استرپتولایزین O را به خود جذب کند. این امر باعث نتایج مثبت کاذب یا گزارش تیتر آنتی‌بادی بالاتر می‌شود. لذا با توجه به این معایب می‌توان از آنزیم استرپتوکیناز و ارزش تشخیصی آن در بیماری‌ها استفاده نمود. بازدهی کم تولید و بیماری‌زایی استرپتوکک‌ها دو دلیل عمده گرایش به سمت تولید این پروتئین به صورت نوترکیب است.[۱۲] بنابراین مطالعه حاضر با هدف تولید استرپتوکیناز استرپتوکک گروه A نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل استرپتوکک پیوژن (شرکتMast)، اشرشیاکلی سویه DH5α و اشرشیاکلی سویه BL21- DE3-plySsa (شرکت Invitrogen) بود.

برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه، از پلاسمیدpTZ57R/T (شرکت fermentas) و جهت تولید استرپتوکیناز A از پلاسمید pET32a (شرکت Novagene) استفاده شد.

تخلیص کروموزوم استرپتوکک پیوژن براساس روش CTAB/NaCl انجام شد. در این روش ابتدا استرپتوکک پیوژن در محیط عصاره مغز و قلب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (Tris 10Mm ; EDTA 1Mm ; PH=8) حل شد. سپس باکتری‌ها با استفاده از آنزیم لیزوزیم و با اثر ماده (سدیم دودسیل سولفات) SDS و آنزیم پروتئیناز k لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (CTAB 10% , NaCl 0.7 M) استخراج شد. پروتئین و سایر اجزای سلولی با استفاده از مخلوط فنل، کلروفرم و الکل ایزوامایل با سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور

در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شدند.
DNA به دست آمده با استفاده از یک حجم ایزوپروپانل رسوب داده شد. سپس توسط اتانل ۷۰ درصد شسته و کمیت وکیفیت آن با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های ۲۸۰ و۲۶۰ نانومتر به دست آمد.[۱۳]

طراحی پرایمر رفت:
{Forward:3'GGGATCCATGAAAAATTACTTATCT5'25}
و پرایمر برگشت:
{Reverse: 3'ACTCGAGTTATTTGTCTTTAGGGT5'(24)}
با استفاده از ترادف استاندارد ژن استرپتوکیناز A، انجام شد. پرایمر رفت دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر برگشت با ترادف لازم برای برش آنزیمی با آنزیم XhoI بود (ترادف آنزیم‌ها با زیر خط مشخص شده‌اند).

تکثیر ژن استرپتوکیناز A با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. غلظت عوامل PCR عبارت بود از: ۵۰۰ نانوگرم از DNA الگو، یک میلی‌مولار از هر پرایمر، ۲/۵ میلی‌مولار از یون منیزیم، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNApolymerase و بافر PCR با غلظت 1X.

برنامه PCR به شکل زیر انجام شد:

مرحله اول، حرارت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم سی چرخه که هریک متشکل از سه قسمت بود:

قسمت اول دناتور کردن (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه). تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه بود.

بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد بافرTBE با PH=۸ انجام شد. نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ‌آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور (اشعه فرابنفش) بررسی شد.[۱۳] محصولPCR با استفاده از کیت تخلیص (شرکت Roche) و براساس دستور کار آن تخلیص شد.

برای کلون‌سازی ژن SKa در پلاسمیدهای pTZ57R/T و pET32a ، ابتدا محصول PCR با آنزیم BamH I و XhoI برش داده شد. سپس ناقلین (pTZ57R/T و pET32a) تحت اثر همان آنزیم‌ها قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از آنزیم T_4 DNA Ligase عمل اتصال ژن SKa در این پلاسمیدها انجام شد. فرآیند آنزیم در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت طبق دستورکار شرکت فرمنتاس بود.

پلاسمید pTZ57R/T-SKa وpET32a -SKa به ترتیب در سلول‌های مستعد اشرشیاکلی سویه DH5α و سویه BL21-DE3-plySs طی فرایند وراریخت وارد شد.

برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتیدی ژن به دست آمده از محصول PCR ، ساختار پلاسمیدی pTZ57R/T-SKa به باکتری اشرشیاکلی سویه DH5 α وارد و جهت تعیین ترادف، به شرکت MWG ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی به روش سنگر تعیین شد.

برای تولید پروتئین SKA ، باکتری اشرشیاکلی تراریخت شده با پلاسمید pET32a -SKA در محیط نوترین براث کشت داده شد. سپس در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با حداقل۱۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد نصاب رسید و درطول موج ۶۰۰ نانومتر برابر۰/۶ شد (OD=0.6)، محلول ۱مولارIPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه شد تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار برسد.[۱۳]

چهار ساعت بعد از افزودن IPTG ، رسوب باکتری با سانتریفیوژ در۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت جمع‌آوری شد. برای بررسی پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری، از ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE استفاده شد.[۱۳]

تخلیص پروتئین با کیت Ni-NTA براساس دستور کار شرکت سازنده (کیاژن)، انجام و مقدار آن با روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

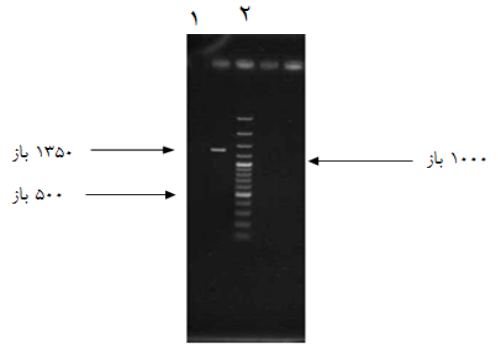
برای تأیید صحت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی‌ژنیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور، ابتدا موش با عصاره کشت استرپتوکک گروه A ایمونیزه شد (تزریق اول از آدجوانت کامل و به فاصله ۲ هفته آدجوانت ناقص استفاده شد). پس از بالا رفتن تیتر آنتی‌بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه شد.

برای انجام وسترن بلات پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE ، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ نیتروسلولز منتقل و عمل انتقال در محیط بافری ۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۹۲ میلی‌مولار گلایسین و ۲۰ درصد متانول به مدت یک ساعت در شدت جریان ۹۰ ولت انجام شد. مرحله مسدودسازی کاغذ نیتروسلولز با قراردادن کاغذ در محلول ۲/۵ درصد آلبومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. سپس کاغذ نیتروسلولز 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.

پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ نیتروسلولزی سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل نیم مولار کلرید سدیم، ۰/۰۲ مولار تریس با PH=۸/۵ و ۰/۰۵ درصد Tween20) و به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ضد موش متصل با پراکسیداز با رقت ۱/۲۵۰۰ انکوبه شد. در نهایت، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی‌ژن با آنتی‌بادی، کاغذ نیتروسلولز در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت.[۱۴]

* یافته‌ها:

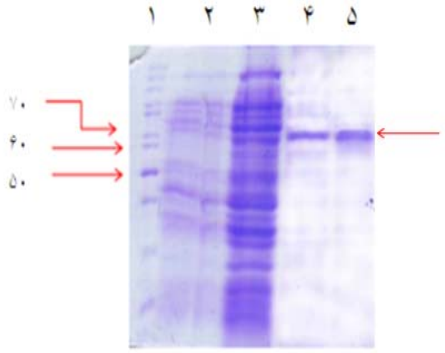
غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکک پیوژن برابر ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن استرپتوکیناز A استفاده شد و اندازه قطعه ژن تکثیر شده توسط PCR در مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی، حدود ۱۳۵۰جفت باز بود (شکل شماره۱).



شکل ۱- نتیجه PCR ژن استرپتوکیناز A
(ستون۱: محصول PCR مربوط به ژن SKa و ستون۲: مارکر۱۰۰جفت باز)

ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده بود با ترادف ثبت شده برای ژن استرپتوکیناز A در بانک ژن، یکسان بود.

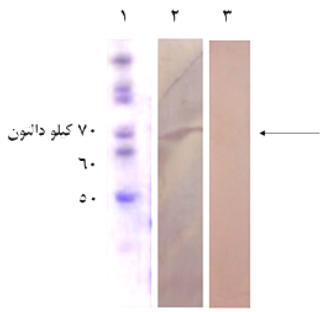
وزن پروتئین تولید شده حدود ۶۷ کیلو دالتون و غلظت آن ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شکل شماره ۲).



شکل ۲- نتیجه القا و تخلیص پروتئین ژن استرپتوکیناز A
(ستون۱: مارکرپروتئین، ستون۲: نمونه قبل از القا، ستون۳: نمونه بعد از القا و ستون ۴ و ۵: پروتئین خالص شده)

در نمونه سرمی موش تلقیح شده با عصاره کشت میکروبی استرپتوکک گروه A، باند مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیترو سلولزی مشاهده شد و

هیچ باندی دال بر واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در نمونه سرم موش طبیعی دیده نشد (شکل شماره۳).



شکل ۳- نتیجه آزمون ایمونوبلات

(ستون۱: مارکر پروتئین، ستون۲: سرم موش تلقیح شده با استرپتوکیناز A و ستون۳: سرم موش طبیعی)

* بحث و نتیجه‌گیری:

در تحقیق حاضر تولید پروتئین استرپتوکیناز استرپتوکک گروه A در باکتری اشرشیاکلی به شکل نوترکیب با استفاده از ناقل پلاسمیدی سیستم pET موفقیت‌آمیز بود. در پلاسمید pET32a ترادف ویژه مربوط به ۶ اسید آمینه هیستیدین در دو سر مکان کلونینگ ژن قرار گرفت. این ترادف برای خالص‌سازی پروتئین‌های تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی (affinity chromatography) به کار می‌رود.[۱۵]

سیستم ناقل پلاسمیدی pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی است. در مطالعه معمار نژادیان و همکاران ژن استرپتوکیناز (skc) از استرپتوکک گروه C، پس از تکثیر به روش PCR در وکتورpQE30 کلون شد که مانند ناقل پلاسمیدیpET قابلیت افزودن توالی 6xHis را به انتهای آمینی پروتئین دارد. نتایج نشان داد که وجود سکانس اضافی 6xHis در انتهای آمینی مولکول استرپتوکیناز نه تنها مانع فعالیت آن نمی‌شود، بلکه امکان تخلیص یک مرحله‌ای و آسان را نیز فراهم می‌آورد.[۱۶]

در سیستم pET ژن هدف تحت کنترل پروموتر قوی T7 بود و در ژنوم میزبان (اشرشیاکلی سویه BL21- DE3-plySs) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتر توسط RNA پلیمراز فاژ T7، که در سلول باکتری کلون شده بود، 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 نیست. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که به پلیمرازهای سلول میزبان وابسته هستند.[۱۳]

اشرشیاکلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هم در تحقیق‌ها و هم در صنعت به طور گسترده به کار می رود.[۱۷و۱۸] از آن جا که میزبان‌های بیانی با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و موتاسیون در پروتئازهای خود، امکان بیان بیش‌تر پروتئین نوترکیب را فراهم می‌آورند، در این مطالعه برای تولید استرپتوکیناز نوترکیب، از سویه BL21-DE3-plySs به عنوان میزبان استفاده شد. این سویه باکتری اشرشیاکلی فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله Degp، OmpT، Lon و HtpR است.[۱۹] بنابراین بیان بالای استرپتوکیناز در اشرشیاکلی سویه BL21- DE3-plySs می‌تواند به دلیل عدم حضور پروتئاز در این باکتری باشد.[۲۰]

پروتئین تولید شده در این سیستم وزنی در حدود ۶۷ کیلو دالتون داشت. علت این امر به واسطه افزودن برخی پروتئین‌های الحاقی ناقل پلاسمیدی (pET32a) به پروتئین نوترکیب تولید شده است. وزن این پروتئین‌های الحاقی در حدود ۲۰ کیلو دالتون بود. مقدار پروتئین تولید شده ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جهت بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب تولید شده در این تحقیق از آزمون وسترن بلات استفاده شد. نتیجه این آزمایش نشان داد که پروتئین تولید شده در مطالعه حاضر خاصیت آنتی‌ژنیک داشت و قادر به شناسایی با آنتی‌بادی‌های ضد استرپتوکیناز A بود. لذا می‌توان از این پروتئین برای تشخیص عفونت ناشی از

استرپتوکک پیوژن به خصوص در عفونت‌های جلدی استرپتوککی بهره برد. به طور کلی به علت معایب مربوط به آزمایش آنتی استرپتولایزین در عفونت‌های جلدی استرپتوککی، اصولاً تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتولایزین O افزایش نمی‌یابد. لذا می‌توان از افزایش تیتر ضد آنتی‌ژن استرپتوکیناز استرپتوکک گروه A به خصوص برای ردیابی گلومرولونفریت استفاده کرد.[۱]

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر ترادف با ژن استرپتوکینازA به طور کامل همخوانی داشت. خاصیت آنتی‌ژنیک پروتئین تولید شده با پروتئین طبیعی یکسان بود. بنابراین شاخص‌های آنتی‌ژنیک مشابه با شکل طبیعی دارد و می‌توان از شکل نوترکیب استرپتوکیناز جهت تشخیص افراد مبتلا به عفونت‌های استرپتوککی گروه A به جای آزمایش آنتی استرپتولایزین استفاده کرد. مطالعه‌های محدودی در کشور در زمینه تولید و استخراج پروتئین استرپتوکیناز با روش نوترکیب انجام شده است و ضرورت دارد به منظور بهینه کردن روش تولید استرپتوکیناز نوترکیب جهت کاربردهای درمانی و تشخیصی، مطالعه‌های بیش‌تری انجام شود.

* سپاس‌گزاری:

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره ۳۶۴ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک و همچنین قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است. لذا از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی قدردانی می‌شود.

* مراجع:

1. Ramalingam S, Gautam P, Mukherjee KJ, Jayaraman G. Effects of postinduction feed strategies on secretary production of streptokinase in Escherichia coli. Biochem Eng J 2007; 33: 34-41

2. Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson microbiology and microbial infections. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005. 657-71

3. Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent. Biotechnol Adv 2004 Feb; 22 (4): 287-307

4. Kim DM, Lee SJ, Kim IC, et al. Asp 41-His48 region of streptokinase is important in binding to a substrate plasminogen. Thromb Res 2000 Jul; 99 (1): 93-8

5. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, et al. Expression of streptokinase in Pichia pastoris yeast. Enzyme Microb Technol 1989; 11: 650-6

6. Sazonova IY, Houng AK, Chowdhry SA, et al. The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. J Biol Chem 2001 Apr 20; 276 (16): 12609-13

7. McArthur JD, McKay FC, Ramachandran V, et al. Allelic variants of streptokinase from Streptococcus pyogenes display functional differences in plasminogen activation. FASEB J 2008 Sep; 22 (9): 3146-53

8. Marx PF, Verkleij CJ, Valls Seron M, Meijers JC. Recent developments in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor research. Mini Rev Med Chem 2009 Sep; 9 (10): 1165-73

9. Huang TT, Malke H, Ferretti JJ. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in Escherichia coli, and sequence analysis. Mol Microbiol 1989 Feb; 3 (2): 197-205

10. Jackson KW, Tang J. Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. Biochemistry 1982 Dec 21; 21 (26): 6620-5

11. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic microbiology. 11th ed. St. Louis: Mosby; 2002. 298-314

12. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring, New York: Harbor Laboratory Press; 2001. 15: 20-5 [Vol 3]

13. Lopez-Saura PA. Thrombolysis with recombinant streptokinase in Cuba. BMJ 2003 Feb 22; 326 (7386): 448

14. Abtahi H, Salmanian AH, Rafati S, et al. High level expression of recombinant ribosomal protein (L7/L12) from Brucella abortus and its reaction with infected human Sera. Iran Biochem J 2004; 8 (1): 13-8

15. Kaulpiboon J, Prasong W, Rimphanitchayakit V, et al. Expression and characterization of a fusion protein-containing cyclodextrin glycosyltransferase from Paenibacillus sp. A11. J Basic Microbiol 2010 Oct; 50 (5): 427-35

16. Memarnejadian A, Roohvand F ،Eidi A, et al. Cloning evaluation of the expression for streptokinase gene with a 6xHis epitope in E.coli. Daneshvar 2007; 69: 61-8

17. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1999 Oct; 10 (5): 411–21

18. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol 2004 Nov; 22 (11): 1399-408

19. Hwang BY, Varadarajan N, Li H, et al. Substrate specificity of the Escherichia coli outer membrane protease OmpP. J Bacteriol 2007 Jan; 189 (2): 522-30

20. Kazmi KA, Perwaiz Iqbal M, Rahbar A, Mehboobali N. Anti-streptokinase titers and response to streptokinase treatment in Pakistani patients. Int J Cardiol 2002 Mar; 82 (3): 247-51