

استرپتوکیناز: استخراج، کلون سازی و بیان بالای پروتئین نو ترکیب فعال با رویکرد تسهیل در فرآیند خالص سازی

محمدرضا نژاد مقدم*، دکتر سید محمد حسین مدرسی**، دکتر محمد باباشمسی***، دکتر محمود چمن خواه***

* مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
*** مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکیناز به عنوان شناخته شده ترین داروی فیبرینولیتیک، مدت مدیدی است در درمان سکتة قلبی استفاده می شود. 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 بگونه ای تکثیر شود که امکان کلون سازی 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 پایین دست ضمن در نظر گرفتن یک جایگاه آنزیم برش دهنده 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 *plysS'* BL21(DE3) ترانسفورم شد. میزان بیان و فعالیت استرپتوکیناز نو ترکیب مربوط به کلون واجد قطعه ۱۲۴۵bp با استفاده از دانسیتومتر لیزری و تست اختصاصی با سوپسترای S2251 در مقایسه با یک نمونه استرپتوکیناز خارجی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: استفاده از یک آنزیم برش دهنده برای دو سر قطعه ژن، کلون شدن آن را در تعداد زیادی از حاملهای بیانی امکان پذیر ساخت. میزان بیان پروتئین نو ترکیب به بیش از ۴۵٪ کل پروتئینهای میزبان، موفقیت در کلون سازی را تأیید کرد. وجود دم اتصالی گلو تاتیون S ترانسفر (GST) مانع فعالیت استرپتوکیناز نشد و مقدار آن بدون بهینه سازی و تخلیص شرایط کشت بیش از ۱۵۰۰۰ u/ml از کشت ثبت شد.

نتیجه گیری: 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 می کند که می توان از آن برای تخلیص یک مرحله ای و آسان با استفاده از لیگاند گلو تاتیون سود برد. واژگان کلیدی: *pGEX-4T-2*، استرپتوکیناز، کلون سازی، پروتئین نو ترکیب، تخلیص.

مقدمه

(۱). در سال ۱۹۹۵ نحوه کنترل نسخه برداری این ژن مورد مطالعه قرار گرفت (۲) و در سال ۱۹۹۶ فعالیت کمپلکس پروموتوری آن آنالیز شد (۳). این ژن سه نوع پلی پپتید تک زنجیره ای با وزنها ۳۰، ۴۵ و ۴۷ کیلودالتون را بیان می کند. نوع ۴۷ کیلودالتون آن در فعال سازی 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 فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، دکتر محمد باباشمسی (email: babashams@avesina.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۸