Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(54): 96-103

The expression of recombinant streptodornase in *E.coli* bacteria

Kamani M(BSc)[1], Abtahi H(PhD)[2*], Mosayebi G(PhD)[2], Nazari R(PhD)[3], Karimi M(BS)[4]

1- Islamic Azad University of Qom, Qom, Iran
2- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Microbiology, Islamic Azad University of Qom, Qom, Iran
4- Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received 26 Jun 2010 Accepted 22 Sep 2010

Abstract

Background: In pyoderma infections, the density of pus is related to desoxiribo-nucleoproteins. The use of streptodornase (DNase) in combination with streptokinase can help dissolve purulent secretions of infections which results in healing the wound through the discharge of pus from the necrotic tissue. The aim of this study was to produce recombinant streptodornase from group A strain of *Streptococcus pyogenes* which is highly efficient in terms of active streptodornase production using expression vector.

Materials and Methods: In this applied-fundamental study, genomic DNA of streptodornase gene (*sd*) was extracted by phenol-chloroform. Then by using specific primers of streptodornase gene, it was amplified through PCR. The resulting streptodornase gene was cloned in pGEX4T1-sd transformer for expression and the pGEX4T1-sd plasmid was transferred to the *sd. E.coli* BL21. Protein production was done by induction via IPTG and optimization of the conditions. The recombinant protein was purified using the glutathione sepharose 4B kit.

Results: The nucleotide sequence of PCR and group A streptodornase *Streptococcus* was totally the same. The production of the streptodornase recombinant protein was done by inducing pGEX4T1-sd plasmid via Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. Protein purification was done through affinity-chromatography by using glutathione sepharose 4B. The recombinant protein was reacted with anti-streptodornase mouse serum through Western-Blot method.

Conclusion: Recombinant streptodornase can be produced by pGEX4T1 in *E. coli*. The recombinant protein maintains its antigenic property desirably. Noticing the domestic need in Iran, low rate of production, and pathogenesis of streptococci, production of this recombinant product is feasible.

Keywords: Gene expression, Streptococcus group A, Streptodornase

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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 14، شماره 1 (شماره پیاپی 54)، فروردین و اردیبهشت 1390، 103-96

بیان استرپتودورناز نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی

محمود کمانی[1]، دکتر حمید ابطحی[2*]، دکتر قاسم مسیبی[3]، دکتر راضیه نظری[4]، مسعوده کریمی[5]

1- دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران

2- استادیار، دکترای تخصصی میکروب شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

3- دانشیار، دکترای تخصصی ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

4- استادیار، دکترای تخصصی میکروب شناسی، گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران

5- کارشناس آزمایشگاه، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت 89/4/5 ، تاریخ پذیرش 89/6/31

چکیده

زمینه و هدف: در عفونت‌های چرکی پوستی، غلظت چرک در ارتباط با دزاکسی ریبو نوکلئوپروتئین هاست.استفاده از استرپتودورناز که یک دزاکسی ریبونوکلئاز است به همراه استرپتوکیناز به حل شدن ترشحات کمک می‌کند، در نتیجه ترمیم زخم در اثر خارج شدن چرک از بافت نکروز شده صورت می‌گیرد. هدف از این مطالعه تولید استرپتودورناز نوترکیب از سوش استرپتوکوک گروه A که از نظر تولید استرپتودورناز پر بازده است، توسط وکتور بیانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بنیادی- کاربردی، DNA ژنومی ژن استرپتودورناز با روش فنل- کلروفرم استخراج گردید، سپس با کمک پرایمرهای اختصاصی ویژه ژن استرپتودورناز، ژن مورد نظر با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر شد. ژن استرپتودورناز به دست آمده در ناقل پلاسمیدی pGEX4T1SD جهت بیان کلون شد و پلاسمید pGEX4T1SD وارد باکتری اشریشیاکلی سویه بی ال 21 گردید. تولید پروتئین با القا توسط ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید و بهینه سازی شرایط صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت گلوتاتیون سفاروز 4 ب خالص گردید.

یافته‌ها: ترادف نوکلئوتیدی محصول ژن واکنش زنجیره ای پلی مراز با ژن استرپتودورناز استرپتوکوک گروه A کاملاً یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب استرپتودورناز با القاء پلاسمیدpGEX4T1 SD توسط تیوگالاکتو پیرانوزید انجام گردید. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت گلوتاتیون سفاروز 4 ب انجام شد. سرم موش واجد آنتی استرپتودورناز در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

نتیجه‌گیری: تولیداسترپتودورناز نوترکیب با استفاده از ناقلین پلاسمیدی نظیر pGEX در میزبان اشریشیاکلی نیز امکان پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند. با توجه به نیاز داخلی کشور و همچنین بازدهی کم تولید و بیماری‌زا بودن استرپتوکوک‌ها تولید این محصول به صورت نوترکیب امکان پذیر است.

واژگان کلیدی: استرپتوکک گروه A، استرپتودورناز ، بیان ژن

***نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

مقدمه

استرپتوکوک‌های پاتوژن پروتئین‌های گوناگونی را در محیط خارج سلولی ترشح می‌کنند که بعضی از این پروتئین‌ها در انسان ایجاد بیماری می‌کنند. یکسری از این پروتئین‌ها علاوه بر نقشی که در بیماری‌زایی دارند، در درمان نیز کاربرد دارند. از جمله این پروتئین‌ها استرپتودورناز و استرپتوکیناز می‌باشند که خاصیت درمانی نیز دارند، استرپتوکیناز به عنوان فعال کننده پلاسمینوژن برای درمان عوامل ترومبولیتیک استفاده می‌شود(1). استرپتوکیناز همچنین می‌تواند در ترکیب با استرپتودورناز که یک دزاکسی ریبونوکلئاز (DNase) است برای شکستن لخته‌های خونی در فضاهای بسته مانند مفاصل و یا حفرات ریوی به کار رود(2).

در بیماری‌های چرکی پوستی (pyoderma)و به طور کلی بیماری‌های چرکی، غلظت چرک در ارتباط با دزاکسی ریبونوکلئوپروتئین‌ها است. بنابراین استفاده از استرپتودورناز که یک دزاکسی ربنونوکلئاز (DNase) است به همراه استرپتوکیناز به حل شدن و تبدیل به مایع شدن ترشحات کمک می‌کنند. در نتیجه ترمیم بافت بر اثر خارج شدن چرک در بافت‌های نکروز شده صورت می‌گیرد(3).

استرپتوکیناز (فعال کننده پلاسمینوژن) برای درمان بیماران با تظاهرات پاراپنمونیایی (Parapneumonic) یا امپیما (Empyema) به دلیل غلظت بالای مایعات ریوی کارساز نیست، در سال 1950 چندین مورد از درمان این بیماران با واریداز (Varidase) گزارش شده است که این دارو شامل هر دو استرپتودورناز و استرپتوکیناز است(6-4).

واریداز یک داروی ثبت شده جهانی است که به عنوان عاملی در پاکسازی زخم‌های چرکی به کار می‌رود و از محصولات خارج سلولی سویه‌های بتا همولیتیک استرپتوکوک‌ها مشتق شده است و شامل دو آنزیم استرپتودورناز و استرپتوکیناز است، استرپتوکیناز پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل کرده و سبب شکست فیبرین و در نتیجه حل شدن لخته‌های خونی می‌شود، حضور این نوکلئوپروتئین‌های خارج سلولی باعث حضور گلبول‌های سفید در زخم‌های محیطی شده و این پدیده با حضور لخته‌های فیبرینی همزمان می‌شود. استرپتودورناز چرک را تبدیل به مایع می‌کند و اجازه حرکت گلبول‌های سفید را داده و باعث افزایش فاگوسیتوز و در نهایت ترمیم زخم می‌شود(7).

استرپتودورناز پروتئینی با وزن مولکولی 38 کیلو دالتون و 271 اسید آمینه می‌باشد(8). و حداکثر فعالیت خود را در pH بین 5 تا 9 انجام می‌دهد و pH ایزوالکتریک آن 7/8 می‌باشد و در رنج دمایی 60-10 درجه سانتی‌گراد می‌تواند فعالیت خود را انجام دهد و دمای بهینه برای حداکثر فعالیت استرپتودورناز 30 درجه سانتی‌گراد با توجه به سوبسترای مورد استفاده می‌باشد(11-9).

مهمترین منبع تولید استرپتودورناز استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک می‌باشند، که ما در تحقیق حاضر از استرپتوکوک گروه A یعنی استرپتوکوک پیوژنز استفاده کردیم، که منبع خوبی برای تولید استرپتودورناز می‌باشد و همچنین منبع خوبی برای ژن استرپتودورناز می‌باشد. با استفاده از استخراج ژن استرپتودورناز از استرپتوکوک پیوژنز، کلون کردن، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب می‌توان مقادیر بالایی از استرپتودورناز نوترکیب را تولید کرد.

با توجه به نیاز داخلی کشورمان به این دارو و قیمت بالای آن نیاز به تولید این دارو در کشور احساس می‌شود. بازدهی کم تولید و بیماری‌زایی استرپتوکوک‌ها دو دلیل عمده گرایش به سمت تولید این پروتئین به صورت نو ترکیب می‌باشد(9).

مواد و روش ها

تولید پروتئین نوترکیب استرپتودورناز یک مطالعه بنیادی - کاربردی است. باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل: استرپتوکوک پیوژن (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس)، اشرشیا کلی سویه DH5α و اشرشیا کلی سویه BL21 (تهیه شده از پژوهشگاه ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشند. برای کلونینگ اولیه و تعیین

ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pTZ (شرکت استراتاژن) و جهت تولید استرپتودورناز از پلاسمید pGEX4T1 (شرکت نوآژن) استفاده شده است. پلاسمیدهای ذکر شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وتکنولوژی زیستی تهیه شده است.

تخلیص کروموزوم استرپتوکوک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکوک پیوژن در محیط تریپتی کیس سوی براث (Trypticase Soy Broth) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (10 میلی مولار تریس کلراید با pH =8 و EDTA یک میلی مولار) حل گردید و با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر سدیم دو دسیل سولفات (SDS) وآنزیم پروتئیناز K لیز شد. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (CTAB10 درصد و NaCl 0/7 مولار) استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل /کلروفرم / ایزوآمیل الکل به نسبت 25/24/1 و سانتریفوژ (13000 rpm به مدت 10 دقیقه) حذف گردید. DNA به دست آمده با استفاده ازیک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس توسط اتانول 70 درصد شستشو شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز 0/8 درصد در بافر TBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه گیری جذب نور در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از ترادف ژن استرپتودورناز طراحی پرایمرهای جلو(Forward) و عقب(Reverse) صورت گرفت:

Forward:5'- AGG ATC CCG ACA AAC ACA GGT CTC -3'
Reverse: 5'-TGG GAT TCT TTT TGA GTA GGT GTA CC-3'

پرایمرها دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم *BamHI* و *EcoRI* می‌باشند (ترادف آنزیم‌ها با Underline مشخص شده‌اند).

تکثیر ژن استرپتودورناز با استفاده از PCR در حجم 50 میکرولیتر انجام شد. غلظت عوامل PCR بقرار 500 نانو گرم از DNA الگو، یک میلی مو لار از هر پرایمر، 2/5 میلی مولار از یون منیزیوم، 200 میلی مولار از هر دزاکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر 1X PCR است. برنامه استفاده شده برای PCR به صورت: حرارت اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه (یک سیکل)، مرحله دوم PCR متشکل از سی سیکل که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتوراسیون (94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (47 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) است. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه است. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 1 درصد در بافر تریس - اسید بوریک - EDTA انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون سازی ژن استرپتودورناز در دو پلاسمید pTZ و pGEX 4T1 بترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR را با آنزیم‌های *Bam*HI و *EcoR*I برش داده وسپس در ناقلین ذکر شده وارد شد. لازم به ذکر است که پلاسمیدهای فوق نیز با آنزیم‌های *Bam*HI و *EcoRI* برش داده شد. عمل اتصال ژن استرپتودورناز در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت 16 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pTZ-SD و pGEX4T1SD را به ترتیب در سلول‌های مستعد اشرشیا کلی سویه DH5α و سویه BL21 وارد می‌نماییم. برای انجام فرآیند ترانسفورماسیون از یون کلسیم و شوک حرارتی استفاده گردید.

برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست

آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی pTZ-SD به شرکت MWG در آلمان ارسال گردید. ترادف نوکلوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر (Sanger) تعیین می گردد.

برای تولید پروتئین استرپتودورناز (SD) باکتری‌های اشرشیا کلی تراریخت شده با پلاسمیدSD-pGEX4T1 را در محیط نوترینت براث کشت داده و در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با حداقل 170 دور قرار می‌دهیم. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (OD=0/6) از محلول یک مولار ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی آن به یک میلی مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن ازوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در 4000 rpm به مدت نیم ساعت به دست آورده شد. برای بررسی نتیجه القا از الکتروفورز رسوب باکتری در ژله درصد پلی آکریل آمید در حضور سدیم دود سیل سولفات استفاده گردید.

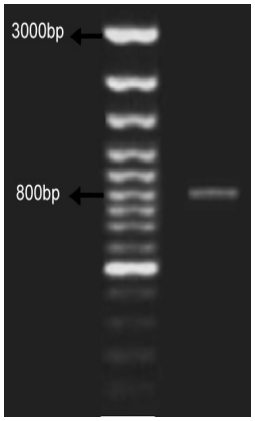
تخلیص پروتئین به وسیله کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از کیت گلوتاتیون سفاروز 4 ب، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن) انجام گرفت.

برای تأیید صحت پروتئین تولید شده از آزمون وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور ابتدا به یک عدد موش در دو نوبت به فاصله یک هفته به صورت زیر جلدی و درون صفاقی عصاره محیط کشت مولر هینتون براث حاوی استرپتوکوک پیوژن به همراه آدجوانت فروند تزریق گردید. پس از بالا رفتن تیتر آنتی بادی بر علیه این پروتئین سرم حیوان تهیه می‌شود.

برای انجام تست ایمنوبلاتینگ (وسترن بلات) پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل 10 درصد پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات، باندهای پروتئینی به دست آمده بر روی ژل آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری 25 میلی مولار تریس، 192 میلی مولار گلایسین و 20 درصد متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان 90 ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ نیترو سلولز با قرار دادن کاغذ در محلول 2/5 درصد آلبومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی ، کاغذ نیترو سلولز به مدت یک ساعت در سرم موش تلقیح شده با عصاره محیط کشت استرپتوکوک پیوژنز (1/100) و یک نمونه سرم موش تلقیح نشده (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ نیتروسلولز سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار، Tris 0/02 مولار با pH برابر 8/5 ، tween20 0/05 درصد) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی بادی موشی کونژوگه با پراکسیداز (1/2500) انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر TBS-T ، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت.

یافته ها

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری استرپتوکک پیوژن برابر 250 میکروگرم بر میلی‌لیتربرآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن استرپتودورناز استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر حدود 816 جفت بازبود(شکل 1).

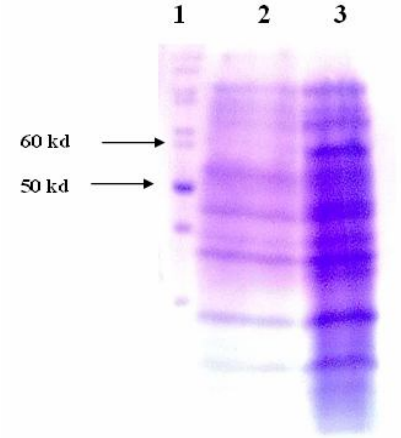


شکل 1. باند bp 816 مربوط به ژن استرپتودورناز (SD) ، ستون1 : مارکر #SM0321 ، ستون 2 : محصول PCR

نتیجه ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTZ

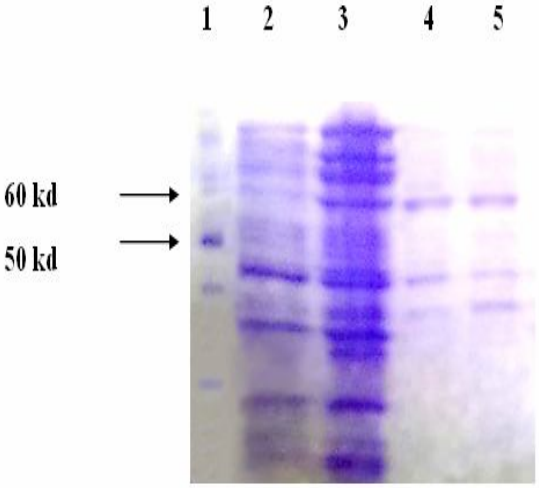
کلون گردیده بود، با ترادف ژن استرپتودورناز یکسان بود.

پروتئین استرپتودورناز پس از 4 ساعت از القا با ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود 38 کیلو دالتون است. نتیجه القای پروتئین استرپتودورناز در شکل 2 آمده است.



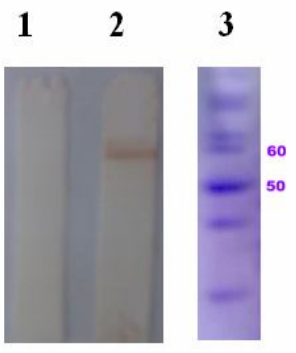
شکل 2: القا پروتئین استرپتودورناز (SD) در پلاسمید pGEX4T1 با استفاده از IPTG ، ستون 1: پروتئین مارکر، ستون 2:نمونه قبل از القا pGEX4T1، ستون 3: نمونه بعد از القا pGEX4T1

خالص سازی پروتئین استرپتودورناز (SD) با استفاده از کیت گلوتاتیون سفاروز 4 ب، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت(شکل3).



شکل 3. القاء و تخلیص پروتئین *SD* در پلاسمید pGEX4T1 با استفاده از IPTG ، ستون 1: پروتئین مارکر، ستون 2:نمونه قبل از القا pGEX4T1SD ، ستون 3: نمونه بعد از القا pGEX4T1SD ، ستون 4و5: پروتئین تخلیص شده

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل 4 آمده است. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه‌های سرم نرمال دیده نشد(شکل 4).



شکل 4 . آزمون وسترن بلات؛ ستون 1: موش طبیعی ، ستون 2: سرم موش تلقیح شده با استرپتودرناز و ستون 3: پروتئین مارکر

بحث

مهمترین منبع تولید استرپتودورناز استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک می‌باشند. تولید فرآورده‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها از باکتری‌های بیماری‌زا با خطر انتقال و انتشار باکتری در محیط روبرو می‌باشد. بنابر این امروزه برای تولید فرآورده‌های این باکتری‌ها بیشتر از روش‌های بیوتکنولوژی استفاده می گردد.

اشرشیا کلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده به کار می‌رود(12، 13). برای تولید استرپتودورناز نوترکیب در این مطالعه از سویه BL21 به عنوان میزبان استفاده شد که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله Lon, OmpT, DegP و HtpR می‌باشد(14). بنابراین بیان بالای استرپتودورناز در *E. coli* سویه BL21 به دلیل عدم حضور پروتئاز در این باکتری باشد.

امروزه پلاسمیدهای مختلفی با وجود پروموتورهای قوی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد. این پلاسمیدها دارای ساختاری می‌باشند که امکان دستیابی به بیان بالای پروتئین به گونه‌ای که گاهی تا 70-60 درصد پروتئین تام باکتری، مربوط به پروتئین بیان شده توسط ناقل مورد نظر می‌باشد.

برای بیان پروتئین استرپتودورناز از ناقلین بیان کننده با یک پروتئین همراه (Fusion Protein)استفاده می‌شود. دراین تحقیق از ناقل pGEX4T1 برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده گردید. با این که پروتئین القا شده در این سیستم متصل به یک پروتئین حدود 20 کیلودالتونی گلوتاتیون - اس- تراسفراز است.

استرپتودورناز با وزن حدود 38 کیلودالتون است. ولی پروتئین تولید شده در این تحقیق دارای وزن حدود 60 کیلو دالتون می‌باشد. علت این امر به واسطه افزوده شدن دنباله 22 کیلودالتونی گلوتاتیون ترانسفراز به پروتئین تولید شده است. بررسی انجام شده در این تحقیق و همچنین سایر تحقیقات نشان می‌دهد که وجود این پروتئین اثری را در سایر پاسخ‌های ایمنی و سنجش‌های ایمنولوژیک (تست‌های الیزا ، تیت تکثیر لنفوسیتی وسنجش سیتوکاینی) ندارد.

نتیجه آزمون وسترن بلات در این تحقیق نشان دهنده ساختار مشابه بین پروتئین نوترکیب تولید شده با فرم طبیعی آن است.

میزان پروتئین تولید شده در این طرح نسبتاً کم می‌باشد. لذا لازم است تا با تغییر شرایط از جمله دما، محیط کشت، طول مدت القاء، تغییر پلاسمید وسایر شرایط لازم در تحقیقات بعدی، میزان تولید پروتئین را افزایش داد.

با وجود امکان تولید پروتئین نوترکیب در حامل‌ها و میزبان‌های گوناگون، هنوز هم تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به عنوان یک مسئله مهم مطرح است. یکی از مهمترین جنبه های تولید یک پروتئین، مرحله خالص سازی آن می‌باشد. هر مرحله خالص سازی هزینه‌های خود را داشته و از طرف دیگر در هر مرحله بخشی از پروتئین به هدر رفته و یا غیر فعال می‌شود، بنابراین هرچه مراحل خالص سازی کمتر باشد به همان اندازه روش تخلیص مناسب‌تر خواهد بود.

از بین روش‌های خالص سازی، استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای چنین منظوری می‌باشد که در آن پروتئین مورد نظر به صورت یک مرحله‌ای و با بازده فراوان به دست می‌آید. کلون نمودن ژن استرپتودورناز در ناقل pGEX4T1 ، استرپتودورناز نوترکیبی واجد دنباله اتصالی گلوتاتیون اس ترانسفراز را حاصل می‌آورد که می‌توان آن را به وسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی با لیگاند گلوتاتیون تخلیص کرد.

با توجه به نیاز داخلی کشورمان به این دارو و قیمت بالای آن نیاز به تولید این دارو در کشور احساس می‌شود. بازدهی کم تولید و بیماری‌زایی استرپتوکوک‌ها دو دلیل عمده گرایش به سمت تولید این پروتئین به صورت نو ترکیب می‌باشد(9).

نتیجه گیری

تولید استرپتوکیناز به صورت نوترکیب در میزبان اشرشیا کلی امکان پذیر است. پروتئین نوترکیب تولید شده از نظر آنتی ژنیسیته با فرم طبیعی یکسان می‌باشد. تولید استرپتودورناز نوترکیب با بازدهی فراوان و قابلیت تخلیص آسان در مقیاس صنعتی، می‌تواند گامی موثر در جهت دستیابی و تولید این دارو به منظور به کارگیری در تولید انبوه این پروتئین دارویی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی "تولید استرپتوکیناز نوترکیب و بررسی آنتی ژنیسیته آن "مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک (طرح 364) و هچنین قسمتی از پایان نامه دانشجویی محمود کمانی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد. لذا بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که که ما را در این پژوهش همکاری کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Sari I, Davutoglu V, Bayram N, Soydinc S. Fatal giant aortic thrombus presenting with pulmonary edema in a patient with chronic

obstructive pulmonary disease. Clin Appl Thromb Hemost. 2008 Oct; 14(4): 486-8.
2. Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. Clin Infect Dis. 2010 Feb; 50(4): 481-90.
3. Johansson L, Thulin P, Low DE, Norrby-Teglund A. Getting under the skin: the immunopathogenesis of Streptococcus pyogenes deep tissue infections. Clin Infect Dis. 2010 Jul; 51(1):58-65.
4. Barto TL, Flume PA. Treatment of pulmonary exacerbations in adult cystic fibrosis patients: a review. Hosp Pract (Minneap). 2010 Feb;38(1):26-34.
5. Ayello EA, Cuddigan JE. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. Adv Skin Wound Care. 2004 Mar;17(2):66-75; quiz 6-8.
6. Light RW, Nguyen T, Mulligan ME, Sasse SA. The in vitro efficacy of varidase versus streptokinase or urokinase for liquefying thick purulent exudative material from loculated empyema. Lung. 2000; 178(1): 13-8.
7. Hawkins SR, inventor AMERICAN CYANAMID CO, assignee. Method of producing streptokinase and streptodornase. United States1955.
8. Proft T, Fraser JD. Streptococcal superantigens. Chem Immunol Allergy. 2007; 93: 1-23.
9. Locke IC, Carpenter BG. Functional characteristics of the streptococcal deoxyribonuclease [`] streptodornase', a protein with DNase activity present in the medicament Varidase®. Enzyme and Microbial Technology. 2004; 35(1): 67-73.
10. Locke IC, Cox SF, Carpenter BG. Purification of a streptococcal deoxyribonuclease by affinity chromatography based on a DNA-cellulose matrix. Journal of Chromatography A. 1997; 788(1-2): 75-80.
11. Locke IC, Carpenter BG. Ion-dependency of the streptococcal deoxyribonuclease "streptodornase", an active constituent of the medicament Varidase®. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 31(4): 482-9.
12. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol. 1999 Oct; 10(5): 411-21.
13. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol. 2004 Nov;22(11):1399-408.
14. Hwang BY, Varadarajan N, Li H, Rodriguez S, Iverson BL, Georgiou G. Substrate specificity of the Escherichia coli outer membrane protease OmpP. J Bacteriol. 2007 Jan; 189(2): 522-30.