Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(57): 97-103

Improvement of recombinant streptokinase production in *E.coli*

Molaee N[1], 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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 14، شماره 4 (شماره پیاپی 57)، مهر و آبان 1390، 103-97

بهینه سازی تولید آنزیم استرپتوکیناز نوترکیب در باکتری اشریشا کلی

ندا مولایی [1]، 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 استرپتوکک پیوژن است. این پروتئین در بیماریزایی باکتری نقش مهمی دارد. در این تحقیق سعی بر تولید بالای این آنزیم به شکل نو ترکیب بوده به‌طوری‌که محصول با تغییر ترکیب محیط کشت و تعداد باکتری القاء شده افزایش یابد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، با استفاده ازروش 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 اشریشیاکلی سویه BL21- DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القاء توسط IPTG و بهینه سازی شرایط محیط کشت و تعداد باکتری‌ها صورت گرفت. پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد. آزمایش وسترن بلات برای تایید پروتئین نوترکیب انجام شد.

یافته ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده با ژن استرپتوکیناز باکتری استرپتوکوک پیوژن یکسان بود. تولید پروتئین نوترکیب 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 محیط‌های گلوکز دار پروتئین بیشتری تولید شد.

نتیجه گیری: تغییر شرایط محیط کشت می‌تواند باعث افزایش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب 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: استرپتوکک گروه A، استرپتوکیناز، بیان ژن

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

Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

مقدمه

استرپتوکک های متعلق به گروه A لانسفیلد عامل بسیاری از عفونت‌های چرکی در انسان می‌باشند. مهمترین عفونت های ناشی از این باکتری‌ها در انسان شامل سلولیت، لنفانژیت، گلو درد چرکی، باد سرخ، زرد زخم و غیره می باشند(1). علاوه بر آن، این باکتری‌ها باعث بروز عوارض دیررس غیر چرکی در انسان می‌شوند. تب روماتیسمی وگلومرولونفریت دو عارضه مهم ناشی از بروز عفونت استرپتوکک های گروه A در انسان هستند(2). استرپتوکیناز یک پروتئین آنزیمی خارج سلولی می‌باشد که توسط سویه های مختلف استرپتوکک های بتا همولیتیک ساخته می‌شود ترشح این آنزیم نقش مهمی در بیماری زایی و تهاجم باکتری در میزبان دارد. این آنزیم توسط اکثر سویه های گروه A وC ترشح می‌گردد (3). استرپتوکیناز A پروتیینی 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 می‌دهد که هتروژنسیتی قابل توجهی بین استرپتوکینازهای تولید شده از گروه‌های مختلف استرپتوکک وجود دارد (5). این آنزیم دارای قدرت آنتی ژنی بوده و در عفونت‌های ناشی از استرپتوکک های گروه A تیترآنتی بادی بر علیه آن افزایش می‌یابد بنابراین می‌توان از این پروتئین برای تشخیص سرولوژیک عفونت‌های استرپتوککی استفاده کرد. در حال حاضر برای تشخیص بیماران مبتلا به عفونت‌های استرپتوککی گروه A از آزمایش آنتی استرپتولایزین (Anti Streptolysin O- ASO) و استرپتولایزین O (Streptolysin O) استفاده می‌شود (6). معایب استفاده از این آنزیم در تشخیص مبتلایان به عفونت‌های 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 تیتر آنتی بادی بالاتر می شود. علاوه بر آن در عفونت‌های جلدی ناشی از استرپتوکک پیوژن ارزیابی آنتی استرپتولیزین 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 استرپتوککی، می‌توان با ارزیابی تیتر آنتی بادی ضد باکتری روند بیماری ناشی از این باکتری‌ها را بررسی نمود. بازدهی کم تولید و بیماری زایی استرپتوکک ها دو دلیل عمده گرایش به سمت تولید این پروتئین به صورت نوترکیب می باشد (8). با استفاده از استخراج ژن استرپتوکیناز از استرپتوکک گروه A، کلون کردن و بیان ژن و تخلیص پروتئین نوترکیب در پلاسمیدهای 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 روش‌ها

در این مطالعه تجربی از باکتری‌های استرپتوکک پیوژن (شرکت Mast)، اشریشیا کلی سویه DH5α و اشریشیاکلی سویه BL21- DE3-plySs (شرکت Invitrogen) استفاده شد. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه، از پلاسمید pTZ57R/T (شرکت fermentas) و جهت تولید استرپتوکیناز A از پلاسمید pET32a (شرکت Novagene) استفاده شد. مواد شیمیایی استفاده شده در این طرح از شرکت مرک (Merck) و آنتی بادی‌ها از شرکت داکو (Dako) تهیه گردید. تخلیص کروموزوم استرپتوکک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت. در این روش ابتدا استرپتوکک 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:

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 مراز 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 پلا سمید pTZ57R/T و pET32a به این ترتیب عمل گردید که ابتدا محصول PCR با آنزیم BamH I و XhoI برش داده شد و سپس در ناقلین 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 سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α 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 اشریشیاکلی سویه α DH5 وارد گردید. پس از آن جهت تعیین ترادف به شرکت MWG ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدی به روش سنگر تعیین گردید. برای تولید پروتیین SKa در باکتری اشریشیاکلی تراریخت شده با پلاسمید pET32a-SKa از محیط‌های کشت با ترکیب مشخص شده در جدول شماره2 استفاده گردید.

سپس القا تولید پروتئین توسط Isopropyl-β-D-thio-galactoside IPTG 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 غلظت‌های مختلفی از باکتری‌ها به ترتیب جذب نوری 0/6، 0/8 و 1 به محیط‌های کشت 1و2 اضافه گردید. چهار ساعت بعد از افزودن IPTG، رسوب باکتری با سانتریفیوژ در 4000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه جمع 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 استروپتوکک

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

جدول شماره 2.ترکیب محیط کشت القاء

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 براث	0/019	0/019
Cacl2	0/013	0/013
حجم نهایی	25میلی لیتر	25 میلی لیتر

تخلیص پروتئین با کیت Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن) انجام گرفت. جداسازی پروتئین‌های 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 می‌باشد. NTA به یون‌های فلزی مانند +Ni2 با پایداری بالایی متصل شده و شرایط سخت شستشو نیز موجب جدا شدن یون‌ها از آن نمی گردد.

برای تخلیص پروتئین‌ها 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

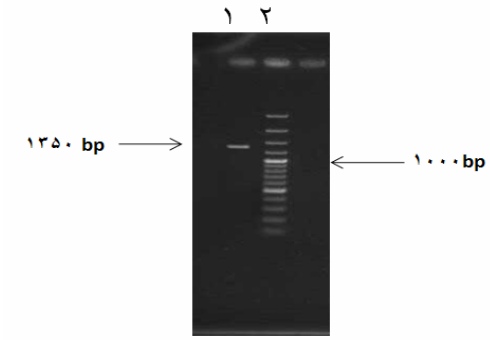
پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی آنتی ژنیک آن از آزمون وسترن بلات استفاده شد. برای این منظور موش قبلا با عصاره کشت استرپتوکک گروه A ایمونیزه شد (تزریق اول از ادجوانت کامل و به فاصله 2 هفته ادجوانت ناقص استفاده شد).

پس از بالا رفتن تیتر آنتی بادی بر علیه این پروتئین، سرم حیوان تهیه گردید. برای انجام وسترن بلات پس از الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری های القا یافته بر روی ژل 10 درصد SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به کاغذ نیتروسلولز 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 نیتروسلولز با قرار دادن کاغذ در محلول 2/5 درصد آلبومین سرم گاوی به مدت 1 ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، 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 و پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه های سرم نوارهای کاغذ نیتروسلولزی سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار pH=8/5، Tris 0/02 مولار، Tween20 0/05 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 نیتروسلولز، 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).

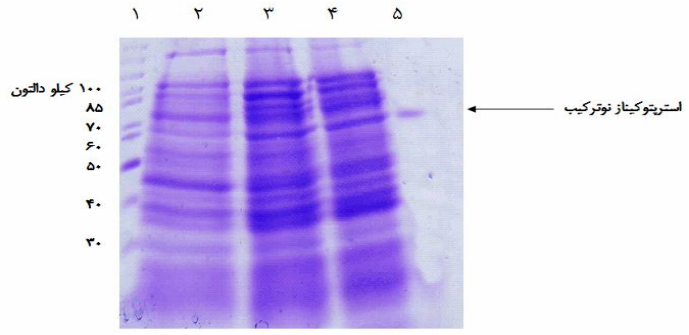
مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pTZ57R/T کلون گردیده بود با ترادف ارائه شده برای ژن استرپتوکیناز A که در بانک ژن ثبت شده است یکسان بود. پروتئین نوترکیب استرپتوکیناز A پس از چهار ساعت از القا با IPTG در هر دو محیط تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده حدود 67 کیلو دالتون بود. نتیجه 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 باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه های سرم نرمال دیده نشد.

مقادیر پروتئین نوترکیب 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.



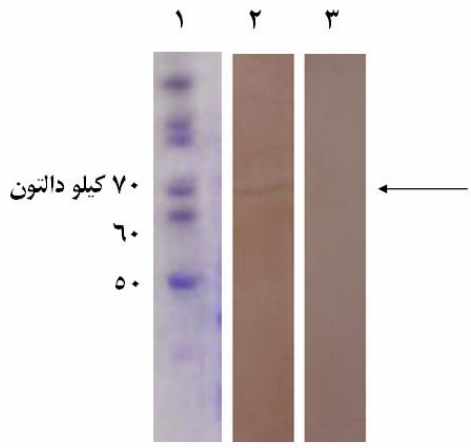
شکل 2. القا پروتئین استرپتوکیناز در پلاسمید pET32a با استفاده از IPTG، ستون 1: پروتئین مارکر، ستون 2: نمونه قبل از القا pET32a-ska، ستون 3: نمونه بعد از القا pET32a-ska، ستون 4: پروتئین تخلیص شده

بحث

استرپتوکیناز تولید شده در این طرح تحقیقاتی از نظر آنتی ژنیسیته مشابه فرم طبیعی آن بود. میزان تولید این پروتئین نوترکیب در

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 سیستم ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی می باشد. 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 نمی باشد. به همین علت تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم هایی 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 (ستون2)، موش طبیعی (ستون3)

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 می توان 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 تفاوت تعداد باکتری‌ها در ابتدای القاء پروتئین، دو فاکتور مورد بررسی در این تحقیق بود. نتایج نشان می دهد که افزودن قند گلوکز نه تنها باعث افزایش تولید پروتئین نمی شود بلکه نسبت به محیط فاقد این قند، مقدار پروتئین کمتری نیز تولید می‌شود. علت این امر را می-توان 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 می شود، تعداد باکتری‌ها نیز می تواند 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 می یابد ولی روند تولید پروتئین در جذب نوری 1، رو به کاهش است. علت این موضوع را باید در ورود باکتری ها 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 پروتئین های الحاقی ناقل پلاسمیدی (pET32a) به پروتیین نوترکیب تولید شده (در حدود 20 کیلو دالتون) می باشد. 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

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 عفونت‌های ناشی از استرپتوکک پیوژن استفاده نمود. با توجه به معایب تست ASO در تشخیص عفونت استرپتوککی به نظر می رسد طراحی کیت‌های تشخیصی بر پایه این استرپتوکیناز نوترکیب می تواند راه گشای تشخیص سرولوژیک این عفونت‌ها باشد.

نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق از نظر سکانس، با ژن استرپتوکیناز استرپتوکک 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 ژنیسیته آن "مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک (طرح 364) و هچنین 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 همکارانی که ما را در این پژوهش همکاری کرده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم.

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.
11.