چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤

مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

استخراج و كلون سازي ژن استرپتو كيناز با رويكرد تسهيل در فرآيند خالص سازي

نژاد مقدم. محمدرضا[1*]، مدرسي. سيد محمد حسين[2] ،باباشمسي. محمد[3]

۱- دانشجوي كارشناسي ارشد دانشگاه آزاد اسلامي واحد جهرم، كارشناس آزمايشگاه جهاد دانشگاهي علوم پزشكي شهيد بهشتي- پژوهشكده ابن‌سينا، تلفن:۲۴۰۲۰۱۱ ،دورنگار: ۲۴۰۳۶۴۱ Email:moghaddam@avesina.ac.ir

۲و۳- عضو هيئت علمي، جهاد دانشگاهي علوم پزشكي شهيد بهشتي – پژوهشكده ابن‌سينا، تلفن:۲۴۰۲۰۱۱ ،دورنگار: ۲۴۰۳۶۴۱

چكيده :

استرپتو كينازبه عنوان شناخته شده ترين داروي فيبرينو ليتيك مدت مديدي است در درمان سكته قلبي مورد استفاده قرار مي گيرد كه مطالعات مقايسه اي انجام شده طي ۱۰ سال گذشته نشان مي دهد كه امتياز كمتري نسبت به ساير داروهاي ترمبو لايتيك مثل tPA ندارد در تحقيق حاضر براي اولين بار در ايران سوش استر پتو كوك equisimilis H46A تهيه گرديد. و پس از استخراج DNA آن ژن استرپتو كيناز با استفاده از دو پرايمر ابتدايي و يك پرايمر انتهايي و واكنش PCR تكثير شد. ضمن اينكه در نظر گرفتن يك جايگاه آنزيم برش دهنده روتين براي دو سر محصولات (كل ORF، bp ۱۳۲۳و قسمت مربوط به پروتئين بالغ، bp ۱۲۴۵)امكان كلون سازي آنها را در حاملهاي متعدد فراهم مي آورد كه .در اين مطالعه ازحامل بياني PQE-30 با قابليت بيان بالا بمنظور توليد استرپتو كيناز نوتركيب اتصالي با ويژگي ساده شدن عمليات تخليص به روش كروماتو گرافي تمايلي- فلز استفاده شد و صحت كلون سازي بوسيله عمليات هضم دو طرفه و تعيين توالي مورد تاييد قرار گرفت.

كلمات كليدي: ژن استرپتو كيناز – S.equisimilis H46A – كلون سازي – حامل PQE-30 –تخليص ساده

مقدمه :

استرپتو كيناز، اين پروتئين ۴۷ كيلو دالتوني كه از طريق ايجاد كمپلكس دو گانه پلاسمينوژن روند فيبرينوليز را تسريع مي كند(Anirban Banerjee et al 2004, M.P.Estrada et al 1992)به عنوان شناخته شده ترين داروي فيبرينوليتيك مدت مديدي است بر عليه بيماريهاي حاصل ازظهور لخته هاي خوني پرآكنده در سيستم گردش خون استفاده مي شود(Collen D et al 1991) مطالعات مقايسه اي انجام شده نشان مي دهد كه امتياز كمتري نسبت به ساير دارو هاي ترمبو لايتيك مثل فعال كننده پلاسمينوژن بافتي(t-PA)ندارد(Anirban Banerjee et al 2004, , Professor T Campbell 1999, Karen Glys.RN et al 2000,). بيشتر مطالعات بر روي استرپتو كوكهاي گروهC به دليل حداقل بودن سم اريتروژنيك و از ميان آنها سوش12449 ATCC H46A equisimilis بدليل بيشتر بودن ميزان توليد(Anirban Banerjee et al 2004)صورت گرفته است. ولي همواره مساله تخليص پروتئين هاي نوتركيب بعنوان يك مشكل مورد توجه بوده است(Anirban Banerjee et al 2004).

مواد و روشها:

استخراج DNA **ژنومي.** با روش ليز سلولها و تغيير جزئي انجام شد(Gase K et al 1996).

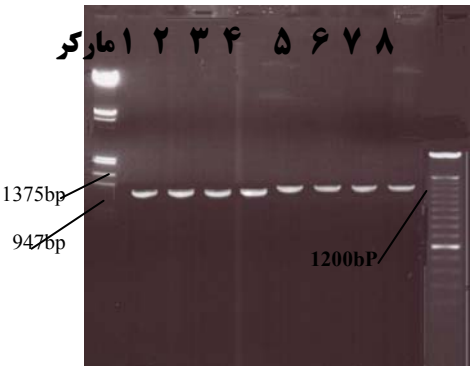
واكنش زنجيره پليمراز(PCR). ژن استرپتو كيناز با پرايمرهاي: ابتدايي STK- 1:$^{5'}$GCTGGATCCATGAAAAATTACTTATCTTTTGG$^{3'}$ازناحيه كدون شروع (قطعه ۱۳۲۳ جفت باز)و 4SKf:$^{5'}$ CGCGGATCCATTGCTGGACCTGAG$^{3'}$ ازناحيه مربوط به استرپتو كيناز بالغ (قطعه ۱۲۴۵ جفت باز)و تك پرايمر انتهاي STK-2:$^{5'}$GCTGGATCCTTATTTGTCGTTAGGGTTATC$^{3'}$ مقادير واكنش۱، ۰/۲، ۳ ، ۱، ۱/۵ ، ۲/۵ و ۱۲/۸ ميكروليتر به ترتيب از: ddH2O,10xPCRbuffer,Mgcl2(1.5mM),dNTPmix(10Mm),Forward primers(5µM), Reverse primers(5µM),TaqDNApolymerase,DNA بابرنامه۲۹ دور(۳۰´´ در ۹۴° ،۳۰´´ در ۵۰° ،۴۵´´ در ۷۲°) تكثير شد(شكل۱). **استخراج حامل.** PQE-30 با استفاده از روش ليز قليايي (Sambrook et al 1989) و دو اصلاح ذيل انجام شد: ۳ميلي ليتر كشت overnight را پس از سانتريفيوژ و دور ريختن ml ۱/۵ مايع رويي به حجمml ۱/۵ رساندیم (بمنظورانجام عمليات در ميكرو تيوپ) همچنين پس از اضافه كردن بافر ليز كنندهI به آن ۱۰ ميكروليتر آنزيم RNaseA (غلظت ۱ mg/ml) اضافه كرديم (با هدف حذف RNA و همچنين حذف خودبخودي آنزيم در حين اضافه كردن محلو لهاي بعدي).**كلون سازي.** هضم حامل و محصول PCR با يك آنزيمBamH I انجام گرديد و تمام

دخولي(insert)و حامل به روش الكترو فورز و روش استخراج از ژل آگاروز(http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html) انجام شد و در نهايت اين قطعه دخولي با فرآيندLigation(sambrok et al1989)در حاملPQE-30 كلون گرديد.**غربال.** كلون هاي حاوي ساختار نوتركيب با كشت مخلوط اتصالي(Ligation mix) روي محيط L.B آگار حاوي آنتي بيوتيك آمپي سيلين،XgalوIPTG و استفاده از روشBlue & Writh انجام شد و توسط الكترو فورز بر روي ژل آگاروز كلونهاي سفيد حاوي پلاسميد هاي سنگين جدا گرديدند(شكل۲).**تاييد.** قرار گيري صحيح insert ،با هضم پلاسميدهاي واجد insert،يكبار با آنزيم BamH I (كه قطعه دخولي را از پلاسميد جدا مي كند)و در بار دوم با آنزيم Hind III (براي جدا شدن قطعه ۵۴۰ جفت باز)انجام گرديد(شكل۳).و در نهايت با تعيين توالي نوكلئوتيد ها بر روي حامل PQE-30واجد ژن استرپتو كيناز، با استفاده از دستگاهAutomated laser Fluores صحت كامل توالي ژن استرپتو كيناز كلون شده و قرار داشتن در جايگاه خواندن(Reading frame)مورد تاييد قرار گرفت و كلون بدست آمده جهت مراحل بيان در ميزبان M15(pREP4) مستعد شده(The QIAexpressionst 2003)ترانسفورم گرديد.

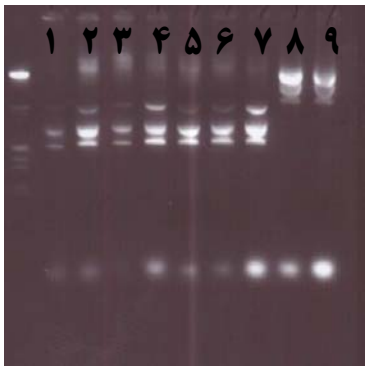
نتايج و بحث:

شرايط بهينه براي جداسازي ژن استرپتو كيناز از ژنوم S.equisimilis H46A تكنيك PCR وغلظتهاي مختلف يون منيزيم و درجه حرارتهاي مختلف كنترل شدو پروتكل استانداردي با پرايمر هاي طراحي شده در كشور به دست آمدوطي عمليات كلون سازي نيز لزوم بعضي اصلاحات در روشهاي موجود جهت كسب نتايج مطلوب لمس گرديد. مطالعه بر روي توليد وتخليص استرپتو كيناز طبيعي بر روي سوش H46A در ايران و در پژوهشكده ابن سينا انجام شد(باباشمسي و همكاران ۱۳۸۲)اكنون نيز ژن مورد نظر براي اولين بار در ايران از همين سويه استخراج و با دو سر - BamH I BamH Iدر حامل PQE-30 كلون گرديد كه همين استراتژي،كلون سازي اين ژن را در حاملهاي متعدد امكان پذير مي سازد.ضمن اينكه باعث شد قطعه دخولي دراولين جايگاه مربوط به كلون چند گانه (MCS) در PQE-30قرار گيردو بدين ترتيب اسيد آمينه ديگري به جز دم هيستيديني به ابتداي N-terminus آنها اضافه نگردد،يكي از اين قطعه دخولي(۱۳۲۳ جفت باز) را مي توان در حاملهاي ديگري كه فاقد كدون شروع و توالي شاين دال گارنو مي باشند كلون نمود در حاليكه قطعه ديگر (۱۲۴۵ جفت باز) كه فاقد نواحي مذكور مي باشد را تنها مي توان در حاملهايي همچونPQE-30كلون نمود(شكل۴)و با اينكار تنها ناحيه مربوط به استرپتو كيناز فعال و بالغ را بيان كرد. چراكه به نظر مي رسد انتهاي آميني استرپتو كيناز تاثير چنداني بر فعاليت آن ندارد(Shi G.Y et al 1994). علي الرغم امكان توليد پروتئين نوتركيب از حاملهاوميزبانهاي گوناگون تخليص پروتئينها ي نوتركيب بعنوان يك مسئله مطرح مي باشد(Anirban Banerjee et al 2004). از آنجائيكه مطالعات نشان مي دهد افزودن توالي 6xHis به پرو تئينهاي نو تركيب كه با هدف سهولت تخليص و شناسايي آنها صورت مي گيرد، عمو ما" تغيير قابل توجهي را در ساختمان و عمل اين پروتئينها بوجود نمي آورد(The QIAexpressionist 2003, Caballero A.R et al 1999) بنابراين با كلون نمودن ژن استرپتو كيناز در حامل PQE-30 ،كه واجد كوچكترين دم اتصالي در مقايسه با ساير سيستمهاي اينچنيني است استرپتوكيناز نوتركيبي به همراه دم اتصالي هيستيديني (6His tag)حاصل مي شود كه مي توان آنرا بوسيله ستون كرو ماتوگرافي تمايل- فلز Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) تخليص كرد. و از امتيازاتي شامل: يك مرحله اي شدن عمل تخليص، كاهش ميزان واسرشتگي(denaturing)، عدم تغيير PH فيزيولوژيكي پروتئين، عدم اضافه كردن خاصيت آنتي ژنيك جديد و كاهش تعداد بافر ها و محلول سازي مرحله تخليص سود برد(The QIAexpressionist 2003) توليد استرپتوكيناز نوتركيب با بازدهي فراوان و قابليت تخليص آسان براي توليد آن در مقياس صنعتي گامي موثر جهت توليد ماده اوليه اين داروي ژنريك كشور مي باشد كه سالانه بيش از يك ميليون دلار هزينة خريد ۵۰ هزار آمپول مصرفي آن مي‌گردد(معاونت غذا و دارو).

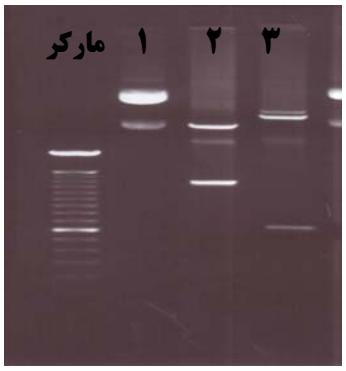
قدر داني: با تشكر از شوراي پژوهش هاي علمي كشور، سازمان مديريت و برنامه ريزي كشور و معاونت پژوهشي جهاد دانشگاهي به خاطر حمايت مالي.



شكل-۱:نتايج حاصل از واكنش PCR پس ازOptimization :باندهای ٤-۱ مربوط به قطعه 1245bp و باندهای ۸-۵ مربوط به قطعه 1323bp .



شكل-۲:الگوی الكترو فورز ژل آگاروز مربوط به پلاسميد هایPQE-30 واجد insert : ستون۱=-PQE 30 استاندارد بدون insert ،ستون۷-۲=PQE-30 بدون insert استخراج شده پس از غربالگری، ستون ۹و۸=احتمالPQE-30 واجدinsert می باشند



شكل-۳: الگوی آنزيمی كلون واجد insert صحيح با آنزيمهایBamH I وHind III در روش double digestion :ستون۱=PQE-30 واجدinsertصحيح، ستون۲=همانPQE-30 برش خورده باBamH I ، ستون۳=همان PQE-30 برش خورده با Hind III .

منابع

Anirban Banerjee, Yusuf Chisti, U.C. Banerjee, Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agen, Biotechnology advances, 22, 287–307, 2004.

Collen .D and Lijnen .H.R, Basic & clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis, Blood, 78, 12, 3114-24, 1991.

Caballero AR, Lottenberg R, Johnston KH, Cloning, expression, sequence analysis, and characterization of streptokinases
secreted by porcine and equine isolates of Streptococcus equisimilis**,** Infect Immune, 67(12), 6478-86, 1999.

Gase K.,Gase A.,Schirmer H.,Malke H,Cloning, sequencing and functional overexpression of the Streptococcus equisimilisH46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein**,** Eur J Biochem, 239(1), 42-
51, 1996.

Karen Glys.RN and Michele Gold, Acute Coronary Syndromes: New Developments in Pharmacological Treatment Strategies, Critical care nurse 20, 2, 2000.

M.P.Estrada,L.Hernandez,A.Perez,P.Rodriguez,R.Serrano,R.Serrano,R.Rubiera,A.Pedraza,G.Padron,W.Antuch,J.de la
Fuente and L.Herrera, High level Expression of Streptokinase in Escherichia Coli, Biotechnology,10,1138-1142,1992.

Professor T Campbell, A Position Statement of the NSW Therapeutic Assessment Group Inc, An initiative of NSW Clinical Pharmacologists & Pharmacists Funded by the NSW Department of Health, First published February 1994 Updated July 1999.

Shi G.Y., Chang B.L., Chen S.M., Wu H.D., and Wu H.L, Functions of streptokinase fragments in plasminogen activation.Biochem J, 304, 235-241, 1994.

Sambrook J. and Russell D.W. Molecular Cloning a laboratory manual. Third edition.CSHL press.2001.

The QIAexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, fifth edition, 2003, available in http://www.qiagen.com.

باباشمسي. محمد،رضويان، سيد محمدحسين و نژادمقدم، محمدرضا. مجموعه مقالات سومين همايش ملي بيوتكنولوژي ايران، جلد چهارم، صفحة (۹۲-۸۹)، سال ۱۳۸۲.

معاونت غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشكي، ، ليست داروهاي وارداتي، آمار ۱۳۷۸

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop