

ایجاد جهش نقطه‌ای در اسید آمینه ۲۶۳ ژن استرپتوکیناز و کلونینگ و بیان پروتئین جهش یافته

حاوی سیستئین

مهسا رضائی^۱، فهیمه باغبانی آرانی^۲ و رضا عربی میانرودی^{۳*}

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۴ چاپ: ۱۳۹۵/۹/۳۰

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران^۲گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران^۳بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران

*مسئول مکاتبات: r_arabi@pasteur.ac.ir

چکیده. استرپتوکیناز یکی از شناخته شده ترین عوامل ترومبولیتیک با مصرف بالینی گسترده است. با وجود این، کاربرد آن به دلیل ایمونوژن بودن، ایجاد عوارض هموراژیک و نیمه عمر نسبتاً کوتاه، همراه با خطرهایی است. پگلاسیون اختصاصی بر روی اسید آمینه سیستئین، تکنیکی مفید جهت کاهش بسیاری از این عوارض است. هدف از مطالعه حاضر، طراحی و تولید مولکول استرپتوکیناز جهش یافته حاوی سیستئین است که برای پگلاسیون اختصاصی قابل استفاده باشد. اسید گلوتامیک ۲۶۳ استرپتوکیناز، که یک اسید آمینه سطحی در ساختار پروتئین استرپتوکیناز است، برای انجام جهش و تعویض با سیستئین انتخاب شد. برای نیل به این هدف، با به-کارگیری روش SOEing PCR، جهش بر روی کدون GLU263 ژن استرپتوکیناز برای تبدیل به کدون سیستئین انجام شد. سپس، ژن استرپتوکیناز دست نخورده و جهش یافته در وکتور بیانی (+) pET-26b وارد شدند. ساختارهای حاصل درون اشریشیا کلی (Rosetta (DE3) ترنسفرم شده و توسط القا با IPTG بیان شدند. در نهایت، تولید پروتئین‌ها به وسیله آزمون‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تأیید شد. پروتئین‌ها به وسیله آفینیتی کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA agarose در شرایط دناتورده با اوره تخلیص شدند و برای حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها از فیلتراسیون ژلی با سفاد کس G-25 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از وکتور و میزبان مذکور ژن جهش یافته حاوی کدون سیستئین به خوبی بیان می شود و برای پگلاسیون اختصاصی مناسب خواهد بود.

واژه‌های کلیدی. ترومبولیتیک، پگلاسیون، اسید گلوتامیک، تخلیص

Point mutation in amino acid 263 of streptokinase gene as well as cloning and expression of the cysteine containing mutated protein

Mahsa Rezaei¹, Fahimeh Baghbani Arani² & Reza Arabi Mianroodi^{3*}

Received 15.02.2016 / Accepted 04.09.2016 / Published 20.12.2016

¹Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran²Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran³Research and Development Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran

*Correspondent author: r_arabi@pasteur.ac.ir

Abstract. Streptokinase is one of the best known thrombolytic agents with widespread clinical use. However, its use is not risk-free due to its immunogenicity, hemorrhagic complications and relatively short half-life in circulation. Specific PEGylation of cysteine residue is a useful technique for reducing most of these complications. The aim of this study was designing and producing a cysteine containing mutant of streptokinase, to be used for specific PEGylation. Glutamic acid 263, which is a surface amino acid in the structure of streptokinase protein, was selected for replacement with cysteine amino acid by site directed mutagenesis. The Glu263 codon was changed to cysteine codon by SOEing PCR technique. Then, the intact and mutated streptokinase genes were inserted into expression vector pET-26b (+). The constructs were transformed to *Escherichia coli* Rosetta (DE3) strain and the proteins were expressed by IPTG induction. The proteins were confirmed by SDS-PAGE and western blot analysis, purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography under denaturing condition with urea and Sephadex G-25 column was applied to remove urea to refold the proteins. This study indicated that by using aforesaid vector and host, cysteine containing mutant gene is expressed well and it will be appropriate for specific PEGylation.

Keywords. thrombolytic, PEGylation, glutamic acid, purification

مقدمه

هرگونه نقص در دستگاه هموستاتیک می تواند موجب تشکیل رگ‌ها و منجر به بروز سکنه‌های مغزی، قلبی، آمبولی ریوی و لخته در گردش خون یا ترومبوز شود. ترومبوز باعث مسدود شدن حتی مرگ می شود. در چنین وضعیتی تجویز درون رگی عوامل

گرفته است که از آن جمله می توان به ایجاد جهش (Wu *et al.*, 1998)، کوتاه کردن (Reed *et al.*, 1999)، استفاده از پروتئین های فیوژن یا کایمریک (Shani *et al.*, 2007)، گلیکوزیلاسیون (Pratap *et al.*, 2000) و پگیلاسیون اشاره کرد. پگیلاسیون، تکنیکی مفید جهت افزایش پتانسیل پروتئین های دارویی با هدف کاهش ایمنی زایی، افزایش نیمه عمر در پلاسما و مقاومت آنها در برابر پروتئولیز است (Chauhan & Meena, 2011; Damodaran & Fee, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Pizzo, 1991; Rajagopalan *et al.*, 1985; Rachmawati *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2002; Veronese, 2001). پگیلاسیون در گذشته به صورت غیراختصاصی و تصادفی روی اسید آمینه های مختلف پروتئین ها انجام می گرفت. این روش باعث ایجاد مخلوط ناهمگنی از پروتئین های پگیله و کاهش فعالیت بیولوژیک پروتئین ها می شد (Rajagopalan *et al.*, 1985; Scott, 1995). امروزه، پگیلاسیون پروتئین ها به صورت اختصاصی روی اسید آمینه سیستمین انجام می گیرد. در پگیلاسیون اختصاصی، از عوامل پلی اتیلن گلیکول فعال شده ای استفاده می شود که با گروه SH برهم کنش می کنند و در واقع با اسید آمینه سیستمین اتصال کووالانت برقرار می کنند (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010). با توجه به فقدان اسید آمینه سیستمین در توالی آمینواسیدی استرپتوکیناز، این پروتئین مولکول ایده آلی جهت ایجاد آنالوگ های سیستمینی و انجام پگیلاسیون اختصاصی است. با استفاده از تکنیک DNA نو ترکیب، می توان سیستمین را به صورت هدفمند جایگزین اسید آمینه هایی کرد که نقش مهمی در فعالیت یا تاخوردگی و ساختار استرپتوکیناز ندارند؛ به طوری که جهش سیستمینی حاصل، کمترین تغییر را در فعالیت بیولوژیک پروتئین ایجاد کند. همچنین، به دلیل این که مولکول پلی اتیلن گلیکول (PEG) مورد نظر، برای انجام واکنش به دسترسی به اسید آمینه های سطحی نیاز دارد، اسید آمینه مورد نظر برای تعویض، باید از میان اسید آمینه های سطحی انتخاب شود (Kumar *et al.*, 2010; Monzavi *et al.*, 2010). همکاران (Monzavi *et al.*, 2010) در باب مولکول استرپتوکیناز مطالعه ای صورت دادند که در آن جهش جایگزین اسید آمینه سیستمین به جای اسید آمینه سرین ۲۰۸ شد؛ نتایج این مطالعه نشان داد که مولکول استرپتوکیناز نو ترکیب جدید، فعالیت بیولوژیک

ترومبولیتیک می تواند بیمار را از مرگ یا عوارض ناشی از سکتته نجات دهد (Baruah *et al.*, 2005; Collen, 1990; Ghosh *et al.*, 2012). این عوامل دارویی با فعال کردن پلاسمینوژن و تبدیل آن به پلاسمین، لخته تشکیل شده را حل می کنند، به همین دلیل به این داروها، فعال کننده های پلاسمینوژن نیز گفته می شود (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Del Zoppo, 2010). از مهم ترین داروهای ترومبولیتیک می توان به استرپتوکیناز (SK) و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) اشاره کرد. مطالعات وسیعی با هدف مقایسه کارایی کلینیکی استرپتوکیناز و tPA انجام شده است، اما این بررسی ها به طور کلی برتری خاصی را در استفاده از این دو دارو در مقایسه با یکدیگر نشان نداده است. از سوی دیگر، اختلاف درخور توجهی بین هزینه تولید و درمان با این دو دارو وجود دارد، به طوری که هزینه تمام شده درمان با استرپتوکیناز در مقایسه با tPA به طور درخور توجهی پایین تر است (Banerjee *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2012).

استرپتوکیناز نوعی فعال کننده قوی پلاسمینوژن، با مصرف بالینی گسترده، عاملی ترومبولیتیک است و یکی از نخستین داروهایی است که توانست مجوز FDA را برای درمان سکتته حاد قلبی کسب کند و در فهرست داروهای ضروری سازمان بهداشت جهانی است (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Sikri & Bardia, 2007). استرپتوکیناز پلی پپتیدی تک زنجیره ای متشکل از ۴۱۴ اسید آمینه با وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون است، که به وسیله گونه های مختلفی از استرپتوکوک های بتا همولیتیک متعلق به گروه های A، C و G تولید می شود (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2012; Pimienta *et al.*, 2007; Rother *et al.*, 2013; Vellanki *et al.*, 2013). کارایی بالینی و قیمت نسبتاً پایین استرپتوکیناز، سبب شده که استرپتوکیناز داروی ترومبولیتیک انتخابی به ویژه در کشورهای در حال توسعه باشد. با وجود این، کاربرد استرپتوکیناز به دلیل ایمونوژن بودن، ایجاد عوارض هموراژیک و نیمه عمر نسبتاً کوتاه همراه با خطر است (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Sikri & Bardia, 2007). به همین منظور، تحقیقات گسترده ای با هدف بهبود ویژگی های درمانی و کاهش عوارض جانبی استرپتوکیناز انجام

خواهد کرد، گلو تامیک اسید ۲۶۳ برای جایگزین شدن با اسید آمینه سیستمین انتخاب شد.

جهش و کلونینگ

پرایمرهای رفت و برگشت با کمک نرم‌افزار GENE RUNNER (version 4.0.9 Beta) طراحی و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند (جدول ۱). با به کارگیری روش PCR و با استفاده از ژن *skc2* که قبلاً در وکتور pQE30 کلون شده بود (Arabi et al., 2011)، به عنوان الگوی اصلی، ژن استرپتوکیناز تکثیر شد. جهش هدفمند به کمک روش SOEing PCR (Sambrook & Russell, 2001) ایجاد و به تکثیر ژن استرپتوکیناز حاوی جهش منجر شد. برای این منظور، ابتدا دو واکنش PCR، جهت ساخت قطعات هم‌پوشان حاوی جهش جایگزینی سیستمین، با اعمال یک سیکل دمای واسرشت شدن (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، دمای اتصال (۵۹ درجه سانتی‌گراد) و دمای پلیمریزاسیون (۷۲ درجه سانتی‌گراد) صورت گرفت. تکثیر قطعات هم‌پوشان که شامل قطعه ۷۸۹ جفت‌بازی (از ابتدای ژن تا جایگاه ۲۶۳) و قطعه ۴۵۳ جفت‌بازی (از جایگاه ۲۶۳ تا انتهای ژن) بود به ترتیب با استفاده از جفت پرایمرهای (F1, R263) و (F263, R414) انجام شد. قطعات هم‌پوشان به دست آمده، به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی، به وسیله کیت خالص‌سازی DNA (یکتا تجهیز، ایران) از ژل آگارز تخلیص شدند. واکنش SOEing PCR در دو مرحله صورت گرفت: در مرحله نخست قطعات هم‌پوشان با نسبت مولی مساوی با یکدیگر مخلوط شدند و واکنش PCR بدون حضور پرایمرها و با اعمال سیکل دمای واسرشت شدن (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، دمای اتصال (۵۰ درجه سانتی‌گراد) و دمای پلیمریزاسیون (۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. بلافاصله پس از اتمام این مرحله، مخلوط واکنش دوم (شامل آنزیم polymerase *pfu* DNA و بافر آن، پرایمرهای F1 و R414، dNTP و MgSO4) به میکروتیوب مرحله نخست افزوده شد تا تکثیر قطعه کامل استرپتوکیناز حاوی جهش به وسیله پرایمرهای ابتدا و انتهای ژن کامل، انجام گیرد. در نهایت، محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز شده و قطعه مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (یکتا تجهیز، ایران) تخلیص شد. ژن دست‌نخورده و جهش استرپتوکیناز، پس از هضم، با آنزیم‌های محدود

خود را حفظ کرده است اما با وجود نتایج مناسب فعالیت بیولوژیک برای این پروتئین جهش، هیچ گزارشی تاکنون مبنی بر پگیلاسیون روی آن وجود ندارد. در تحقیق گسترده تری که توسط Kumar و همکاران (2012) انجام شد، جهش‌های سیستمینی از مولکول‌های استرپتوکیناز طراحی و ساخته شدند (جهش‌هایی غیر از تحقیق حاضر) و در نهایت پگیلاسیون اختصاصی روی این مولکول‌های استرپتوکیناز انجام گرفت. نتایج این تحقیق اثبات کرد که پگیلاسیون اختصاصی موجب بهبود خصوصیات استرپتوکیناز از جمله افزایش مقاومت به پروتئولیز، افزایش نیمه عمر و کاهش ایمنی‌زایی آن می‌شود. با وجود انجام پگیلاسیون‌های متعدد، تاکنون داروی استرپتوکیناز پگیله در بازار دارویی دنیا وجود نداشته است. هدف از مطالعه حاضر، طراحی و تولید مولکول استرپتوکیناز جهش یافته جدید حاوی سیستمین (به غیر از جهش‌هایی که محققان دیگر ایجاد کرده‌اند) است که برای پگیلاسیون اختصاصی قابل استفاده باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب اسید آمینه برای تعویض

با استفاده از توالی اسید آمینه‌ای پروتئین استرپتوکیناز، که در پایگاه اطلاعاتی Protein Databank (www.pdb.org) موجود است و با به کارگیری نرم‌افزار SPDB viewer (version 4.01)، ساختار سه‌بعدی پروتئین استرپتوکیناز تحت بررسی قرار گرفت و اسید آمینه‌های سطحی آن به وسیله نرم‌افزار مشخص شد. ساختار پروتئین استرپتوکیناز پس از مشخص شدن اسید آمینه‌های سطحی در درون نرم‌افزار مشاهده و بررسی شد. به این منظور، ابتدا اسید آمینه‌های سطحی توسط گزینه دسترسی نرم‌افزار مشخص شدند و به صورت جداگانه در ساختار پروتئین استرپتوکیناز توسط نرم‌افزار رنگی شدند. سپس، ساختار استرپتوکیناز با پلاسمینوژن در نرم‌افزار کمپلکس شد و به صورت چشمی، موقعیت مکانی اسید آمینه‌های سطحی رنگی شده نسبت به جایگاه فعال روی پلاسمینوژن کمپلکس شده (اسید آمینه‌های ۵۴۱ تا ۷۹۱) تحت بررسی قرار گرفت. با این منظر که پگیلاسیون روی اسید آمینه‌های سطحی، که به اندازه کافی از جایگاه فعال دور باشند، کم‌ترین تداخل را برای تشکیل کمپلکس فعال ایجاد

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر استرپتوکیناز جهش یافته و دست نخورده.

Table 1. Primers used for amplification of the intact and mutated streptokinase.

نام پرایمر	توالی پرایمر
F1	5'-GACGAGAC <u>CATATG</u> ATTGCTGGACCTGAGTG-3'
R414	5'-GACACTCGAGTTTGTTCGTTAGGGTTATCAG-3'
F263	5'-CTGGTCTGAATGAATGCATAAAACAACACTGAC-3'
R263	5'-CAGGTCAGTGTGTTTATGCATTCATTCAG-3'

جایگاه شناسایی آنزیم های محدود کننده به صورت خط زیر و کدون سیستین به صورت پررنگ نشان داده شده است.

Underlined letters represented restriction enzymes recognition sites and bold faced letters represented mutated codon

آنزیم HRP به عنوان آنتی بادی ثانویه، پس از افزودن محلول DAB، وجود باندهای اختصاصی استرپتوکیناز دست نخورده و جهش یافته تحت بررسی قرار گرفت. خلص سازی پروتئین های تأیید شده، با استفاده از روش کروماتو-گرافی تمایلی با ستون Ni-NTA agarose در شرایط واسرشت با اوره (۸ مولار) انجام گرفت (Arabi et al., 2011). حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین ها با به کارگیری کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی با استفاده از ژل سفادکس G-25 به منزله فاز ثابت و بافر حاوی (۵۰ mM) Tris base و (۲۵ mM) NaCl با pH ۷/۵ به عنوان فاز متحرک صورت گرفت.

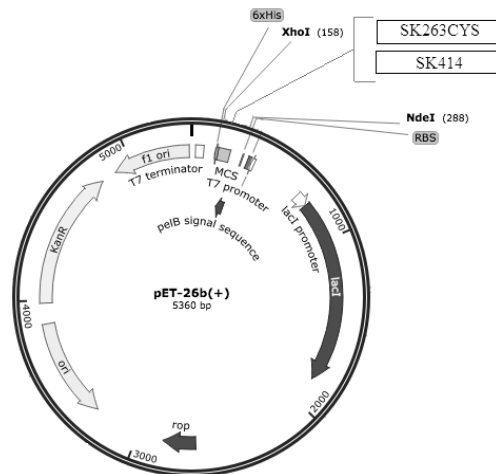
نتایج

با استفاده از نرم افزار SPDB viewer، ساختار سه بعدی پروتئین استرپتوکیناز بررسی شد و گلو تامیک اسید ۲۶۳، که اسید آمینه ای سطحی است، جهت انجام جهش جایگزینی با اسید آمینه سیستین انتخاب شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، اسید آمینه گلو تامیک اسید ۲۶۳ در دمین بتا قرار دارد و دارای فاصله کافی با دمین گاما (که از لحاظ فضایی به جایگاه کاتالیتیک پلاسمینوژن نزدیک است) است. به منظور ایجاد جهش، ابتدا قطعات هم پوشان حاوی جهش با استفاده از جفت پرایمرهای (F1, R263) و (F263, R414) تکثیر شدند (شکل ۳A). پس از تخلیص، این قطعات در مرحله بعدی با کمک روش SOEing PCR هم پوشان شدند و قطعه کامل حاوی جهش ایجاد شد (شکل ۳B). در نهایت ایجاد جهش در مکان مورد نظر با استفاده از روش تعیین توالی به تأیید رسید (شکل ۴). ژن دست نخورده و جهش یافته استرپتوکیناز،

کننده *NdeI/XhoI* (Fermentas, Romania) درون وکتور pET-26b(+) کلون شدند (شکل ۱). سازه های ژنی حاوی ژن دست نخورده و جهش یافته که به ترتیب pETSK263Cys و pETSK414 نامیده شدند، درون سلول های مستعد *اشرشیا کلی* سویه DH5α به منزله میزبان کلونینگ ترانسفرم شدند (Sambrook & Russell, 2001). پس از غربالگری کلون های حاوی وکتور مورد نظر در محیط کشت کاناماسین دار، تخلیص پلاسمید توسط کیت (یکتاتجهیز، ایران) انجام گرفت و کلون های حاوی ژن مورد نظر به وسیله هضم با آنزیم های محدود کننده شناسایی شدند. به منظور تأیید نهایی، پلاسمید نو ترکیب حاوی استرپتوکیناز جهش یافته، برای اطمینان از وجود کدون اسید آمینه سیستین در جایگاه ۲۶۳ و فقدان هر گونه جهش نقطه ای دیگر، به وسیله شرکت MacroGen کره جنوبی از دو طرف تعیین توالی شد.

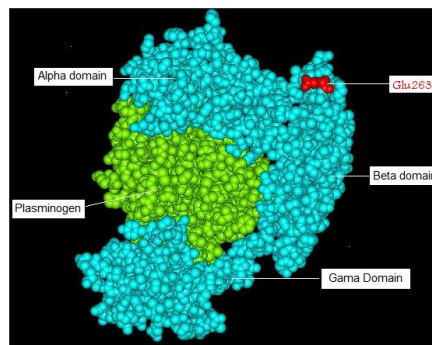
بیان و تخلیص پروتئین

به منظور بیان پروتئین ها، سازه های ژنی pETSK263Cys و pETSK414 در سویه بیانی *E. coli* Rosetta ترانسفرم شدند و پس از کشت در محیط TY2X الفاء بیان پروتئین ها به وسیله IPTG (Sigma, USA) با غلظت نهایی یک میلی مولار صورت گرفت و بیان پروتئین ها با استفاده از تحلیل SDS-PAGE ارزیابی شد. جهت شناسایی و تأیید قطعی پروتئین ها از تکنیک وسترن بلات استفاده شد (Sambrook & Russell, 2001). برای این منظور، ابتدا باندهای مربوط به پروتئین استرپتوکیناز دست نخورده و جهش یافته، به غشاء نیتروسولوزی منتقل شده و با استفاده از آنتی-بادی ضد His-tag به عنوان آنتی بادی اولیه و آنتی بادی کنترول با



شکل ۱- نمایی شماتیک از وکتور pET-26b و جایگاه ورود ژن استرپتوکیناز. ژن‌های دست‌نخورده و جهش‌یافته استرپتوکیناز از طریق جایگاه‌های برش آنزیم‌های *XhoI* و *NdeI* در وکتور وارد شده‌اند.

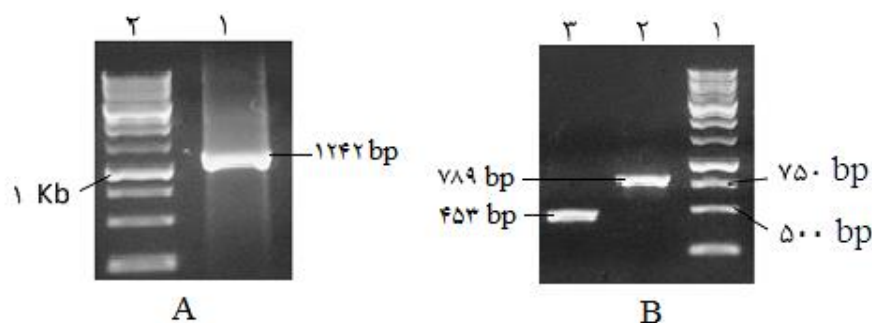
Fig. 1. Schematic illustration of pET-26b vector and insertion site of streptokinase gene. Intact and mutated streptokinase genes were inserted into the vector by *NdeI* and *XhoI* restriction sites.



شکل ۲- ساختار کمپلکس استرپتوکیناز-پلازمینوژن.
Fig. 2. Structure of streptokinase-plasminogen complex.

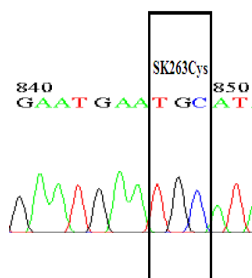
مشاهده‌نشده (نتایج نشان داده نشده‌اند). از این رو، سازه‌ها درون میزبان بیانی *E. coli* Rosetta (DE3) ترانسفرم شدند و بیان پروتئین‌های نو ترکیب در این میزبان مورد بررسی قرار گرفت. این بار نتایج حاصل از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل آمید نشان داد که هم پروتئین دست‌نخورده و هم پروتئین جهش‌یافته به‌طور کاملاً آشکار درمقایسه با نمونه القاننده، بیان و تولید شده‌اند (شکل ۵A). سپس، با به‌کارگیری تکنیک وسترن‌بلات، وجود باندهای اختصاصی مربوط به پروتئین‌های استرپتوکیناز جهش و دست‌نخورده اثبات شد (شکل ۵B). پروتئین‌های بیان‌شده با استفاده از کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA agarose در شرایط واسرشت با درجه خلوص بیش از ۹۰ درصد خالص شدند. به‌منظور تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها و حذف اوره مورد استفاده در مراحل

در جایگاه *NdeI/XhoI* وکتور pET-26b(+) کلون‌شد و سازه‌های ژنی حاصل به‌نام‌های pETSK263Cys و pETSK414 درون باکتری *E. coli* DH5a ترانسفرم شدند. با استفاده از هضم آنزیمی، کلونینگ ژن دست‌نخورده و جهش‌یافته استرپتوکیناز در وکتور pET-26b(+) مورد تأیید قرار گرفت و تعیین توالی مجدد ژن در سازه pETSK263Cys، ایجاد جهش در نقطه مورد نظر (جایگاه ۲۶۳) و فقدان هرگونه جهش نقطه‌ای دیگر را تأیید کرد. به‌منظور بیان پروتئین‌های دست‌نخورده و جهش‌یافته، سازه‌های به‌دست‌آمده درون *E. coli* BI21 (DE3) ترانسفرم شدند و تولید پروتئین‌ها با استفاده از IPTG القاء شد. پس از بررسی سلول‌های القا شده به‌روش SDS-PAGE، هیچ باند پروتئینی ۴۷ کیلودالتونی روی ژل پلی‌اکریل آمید (درمقایسه با نمونه القاء‌نشده)



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز. **A:** تکثیر قطعات هم پوشان حاوی جهش؛ ستون ۱، مارکر 1kb (SM0313) شرکت فرمنتاس؛ ستون ۲، قطعه ۷۸۹ جفت بازی؛ ستون ۳، قطعه ۴۵۳ جفت بازی. **B:** تکثیر ژن استرپتوکیناز جهش؛ ستون ۱، استرپتوکیناز جهش؛ ستون ۲، مارکر 1kb (SM0313) شرکت فرمنتاس.

Fig. 3. Gel electrophoresis of PCR products. **A:** Amplification of overlapped fragments containing mutation; lane 1, Fermentas DNA ladder, 1kb (SM0313); lane 2, 789 base pair fragment; lane 3, 453 base pair fragment. **B:** Amplification of mutated streptokinase gene; lane 1, mutated SK; lane 2, Fermentas DNA ladder, 1kb (SM0313).



شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی آنالوگ سیستئینی SK263Cys که کدون سیستئین در آن مشخص شده است.

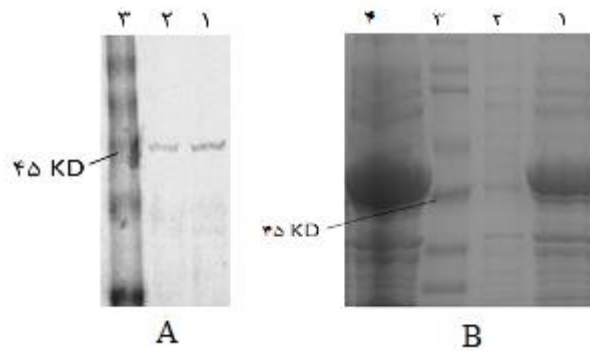
Fig. 4. Nucleotide sequence of cysteine analogue SK263Cys that cysteine codon is distinct in it.

مولکول استرپتوکیناز جهش یافته حاوی سیستئین دست یافت (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010). بر همین اساس، در مطالعه حاضر تلاش شده است تا با طراحی و ساخت استرپتوکیناز جهش جدید حاوی سیستئین (به غیر از جهش هایی که محققان دیگر ایجاد کرده اند)، امکان انجام پیگلاسیون اختصاصی روی این پروتئین دارویی در ایران فراهم شود. جهت تعیین جایگاه جهش، همانند مطالعات مشابه (Kumar *et al.*, 2010; Monzavi *et al.*, 2012) مواردی همچون دردسترس بودن و سطحی بودن اسید آمینه انتخابی و دور بودن آن از جایگاه فعال پروتئین پلاسمینوژن در نظر گرفته شد و با توجه به نتایج ارزیابی های کامپیوتری اسید آمینه گلو تامیک اسید در جایگاه ۲۶۳، به منظور جایگزینی با اسید آمینه سیستئین انتخاب شد. بررسی ساختاری استرپتوکیناز به صورت چشمی در نرم افزار SPDB viewer نشان داد که اسید آمینه انتخاب شده هم سطحی بوده و

تخلیص، که می توانست موجب واسرشت شدن و غیرفعال شدن پروتئین ها شود، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی انجام گرفت. نمودارهای حاصل از فیلتراسیون ژلی پروتئین استرپتوکیناز دست نخورده و جهش با استفاده از ستون سفادکس G-25، نشان دهنده خروج اوره از محلول های پروتئینی بود (شکل ۶). محلول های پروتئینی پس از تعویض بافر، فاقد هر گونه رسوب و تجمع پروتئینی بود. اما نتایج غلظت سنجی نشان داد که محلول های پروتئینی تقریباً دوونیم برابر رقیق شده اند.

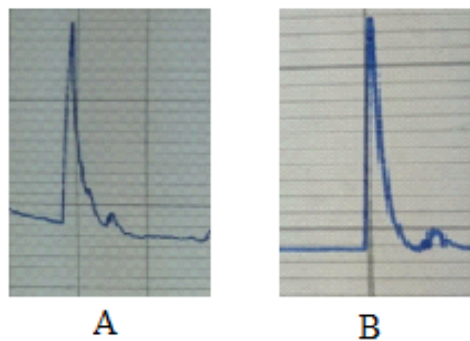
بحث

یکی از مهم ترین روش های بهینه سازی استرپتوکیناز، پیگلاسیون اختصاصی روی اسید آمینه سیستئین است. نتایج مطالعات پیشین نشان می دهد که در صورت توجه به ویژگی های ساختاری و عملی - کردی پروتئین استرپتوکیناز، می توان با حفظ فعالیت بیولوژیک به



شکل ۵- A: تحلیل SDS PAGE پروتئین دست‌نخورده و جهش‌یافته استرپتوکیناز؛ ستون ۱، باند پروتئینی مربوط به استرپتوکیناز دست‌نخورده؛ ستون ۲، نمونه القاء‌نشده استرپتوکیناز؛ ستون ۳، مارکر پروتئینی Blue Plus؛ ستون ۴، باند پروتئینی استرپتوکیناز جهش‌یافته. **B:** وسترن بلات باندهای پروتئینی استرپتوکیناز؛ ستون ۱، باند پروتئینی استرپتوکیناز دست‌نخورده؛ ستون ۲، باند پروتئینی استرپتوکیناز جهش‌یافته؛ ستون ۳، مارکر پروتئین‌یاز پیش‌رنگ‌شده Blue Plus.

Fig. 5. A: SDS-PAGE analysis of intact and mutated streptokinase proteins; lane 1, intact streptokinase; lane 2, non-induced SK; lane 3, Blue Plus protein marker; lane 4, Mutated streptokinase. **B:** Western blot analysis of SK proteins; lane 1, intact streptokinase; lane 2, Mutated streptokinase; lane 3, pre-stained Blue Plus protein marker.



شکل ۶- نمودار کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی؛ نمودار A: جداسازی اوره از استرپتوکیناز جهش‌یافته، **B:** جداسازی اوره از استرپتوکیناز دست‌نخورده؛ در هر دو نمودار، پیک نخست (پیک بزرگتر) مربوط به پروتئین و پیک دوم مربوط به اوره است. مولکول‌های اوره به دلیل کوچک‌تر بودن از درون منافذ ذرات ژل عبور کرده و به همین دلیل دیرتر از ستون خارج می‌شوند اما پروتئین استرپتوکیناز به دلیل بزرگ بودن از لابلاي ذرات ژل رد شده و زودتر خارج می‌شود.

Fig. 6. Diagrams of gel filtration chromatography; diagram **A:** separation of urea from mutated SK; diagram **B:** separation of urea from intact SK; in both of diagrams the first peak is related to protein and the second peak is related to urea.

که سویه *E. coli* Rosetta (DE3) موجب افزایش بیان پروتئین‌ها می‌شود. علت این مسئله، می‌تواند متفاوت بودن کد اسیدآمین‌های مورد استفاده در این دو سویه باشد؛ به این معنی که احتمالاً سویه Rosetta به دلیل دارا بودن t-RNAهای کمیاب، موجب بیان کدون‌هایی می‌شود که به ندرت در *E. coli* استفاده می‌شود؛ در نتیجه استفاده از این سویه موجب افزایش بیان پروتئین‌ها می‌شود (Fu et al., 2007). نتایج تحقیق حاضر نیز به‌طور مشابه نشان داد که با استفاده از سویه *E. coli* Rosetta (DE3) بیان پروتئین‌ها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. یکی از مهم‌ترین مراحل تولید

به احتمال زیاد پس از پگیلاسیون تداخلی در ایجاد کمپلکس با پلاسمینوژن ایجاد نخواهد کرد. گفتنی است که در هیچ‌یک از مطالعات پیشین، اسید آمینه گلوتامیک اسید ۲۶۳ جهت تعویض با اسید آمینه سیستئین استفاده نشده است. نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید نشان داد که پروتئین‌ها در سویه *E. coli* BI21 (DE3) بیان نشده‌اند و یا به مقدار کم بیان شده که با روش الکتروفورز قابل ردیابی نبودند. در مطالعه دیگری که با هدف مقایسه میزان بیان پروتئین‌ها در سویه‌های *E. coli* Rosetta (DE3) و *E. coli* BI21 (DE3) انجام گرفته بود، نشان داده شد

سپاسگزاری

هزینه‌های مالی این تحقیق، که قسمتی از طرح ۷۰۱ است، از بودجه پژوهشی انستیتو پاستور ایران تأمین شده است. بدین وسیله از حمایت‌های دکتر آقاصادقی رییس بخش هیاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران و کمک‌های تکنیکی خانم متولی قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Arabi, R., Roohvand, F., Noruzian, D., Aghasadeghi, MR., Memarnejadian, A., Khanahmad, H., Sadat, M. and Motevali, F. 2011. Cloning and expression of truncated and intact streptokinase molecules in E.coli and evaluation of their biological activities. – J. Agricul. Biotech. 2: 55-67.
- Banerjee, A., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2004. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. – Biotec. Adv. 22: 287-307.
- Baruah, D.B., Dash, R.N., Chaudhari, M.R. and Kadam, S.S. 2005. Plasminogen activators: A comparison. – Vascu. Pharmacol. 44: 1-9.
- Bornhorst, J. and Falke, J.J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. – Methods Enzymol. 326: 245-254.
- Chauhan, S. and Meena, S. 2011. Pegylation - A Sunrising Technology. – IPS 1: 18-24. Collen, D. 1990. Coronary thrombolysis: streptokinase or recombinant tissue-type plasminogen activator. – Ann. Intern. Med. 112: 529-538.
- Damodaran, V.B. and Fee, C.J. 2010. Protein PEGylation: An overview of chemistry and process considerations. – Eur. Pharmace. Rev. 15: 18-26.
- Del Zoppo, G.J. 2010. Plasminogen activators in ischemic stroke: introduction. – Stroke 41: 39-41.
- Fu, W., Lin, J. and Cen, P. 2007. 5-Aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 75: 777-782.
- Ghosh, M., Pulicherla, K.K., Rekha, V.P.B., Venkat Rao, G. and Rao, K. 2012. A review on successive generations of streptokinase based thrombolytic agents. – Int. J. Pharm. Sci. 4: 38-42.
- Kumar, S., Maheshwari, N. and Sahni, G. 2012. Mutants of streptokinase and their covalently modified forms. – US Patent Number: 8093032 B2.
- Monzavi, N., Aghasadeghi, M.R., Arabi, R., Memarnejadian, A., Sadat, S.M., Khanahmad, H., Ebrahimi, M. and Roohvand, F. 2010. Design, cloning, expression and evaluation of cysteine-substitutes of intact and truncated molecules of streptokinase. – Iran JPP 14: 56-65.
- Pimienta, E., Ayala, J.C., Rodríguez, C., Ramos, A., Melleraert, L.V., Vallín, C. and Anné, J. 2007. Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*. – Microb. Cell Fact 6: 1-8.
- Pizzo, S.V. 1991. Preparation, in vivo properties and proposed clinical use of polyoxyethylene-modified tissue plasminogen activator and streptokinase. – Adv. Drug Deliv. Rev. 6: 153-166.

پروتئین نو ترکیب خالص سازی آن است. هرچه مراحل تخلیص کمتر باشد، بازده تولید پروتئین بالاتر است. پروتئین‌های استرپتوکیناز تولید شده در این مطالعه، به واسطه داشتن برجسب هیستیدینی (6xHis-tag) قابلیت تخلیص با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی با ستون Ni-NTA agarose را دارا بودند. باتوجه به این که بیان بالای پروتئین‌ها در باکتری *E.coli* می‌تواند موجب تولید پروتئین نو ترکیب به صورت نامحلول و تشکیل اجسام توده‌ای شود (Werner *et al.*, 1994)؛ احتمال داشت که تخلیص پروتئین‌ها در شرایط واسرشت نشده، موجب کاهش بازده تخلیص شود (Bornhorst & Falke, 2000). بنابراین، خالص سازی پروتئین‌ها در شرایط واسرشت با اوره انجام گرفت تا پروتئین‌ها به صورت محلول درآیند و تخلیص آنها تسهیل شود. پس از تخلیص با این روش، از فیلتراسیون ژلی جهت حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها استفاده شد. از مزایای این روش نسبت به روش استفاده از کیسه دیالیز می‌توان به ساده تر بودن، کوتاه تر بودن از لحاظ زمانی و درصد بیشتر ساختار درست پروتئین اشاره کرد. علاوه بر این، پروتئین‌ها پس از انجام فیلتراسیون ژلی احتمالاً کمی خالص تر نیز می‌شوند. تنها ایراد این روش، رقیق شدن پروتئین‌ها پس از تعویض بافر است که در این مطالعه نیز مشاهده شد که پروتئین‌ها حدود ۲/۵ برابر رقیق شده‌اند. اما برخلاف دیالیز، در فیلتراسیون ژلی احتمال جمع شدن و تاخوردگی نامناسب پروتئین‌ها، کم است. نمودارهای به دست آمده از فیلتراسیون ژلی پروتئین استرپتوکیناز دست نخورده و جهش، گواه بر خروج اوره از نمونه‌ها بوده و محلول‌های پروتئینی حاصل، کاملاً شفاف و بدون هیچ رسوب پروتئینی حاصل از جمع شدن مشاهده شد که این نتایج مطابق با مطالعات پیشین (Werner *et al.*, 1994) است. نتایج حاصل از این تحقیق منجر به ساخت سازه ژنی و سوبه‌ای نو ترکیب با قابلیت تولید پروتئین جهش یافته با بازده مناسب شد که دارای اسید آمینه سیستئین به جای اسید گلوتامیک ۲۶۳ است. نظریه این که پروتئین جهش یافته یادآوری شده حاوی اسید آمینه سیستئین در سطح مولکول است، در صورت اثبات عدم کاهش فعالیت بیولوژیک، انتخاب ایده آلی برای انجام پگیلاسیون اختصاصی در پروژه‌های آتی خواهد بود.

Pratap, J., Rajamohan, G. and Dikshit, K.L. 2000. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 469-475.

Rachmawati, H.D.F., Darfiansyah, I.A. and Retnoningrum, D.S. 2014. PEGylation of recombinant mitein streptokinase from overproduction in *Escherichia coli* BL-21 and study on the fibrinolytic activity in vitro. – Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6: 137-141.

Rajagopalan, S., Pizzo, S.V. and Gonias, L.S. 1985. A nonantigenic covalent streptokinase-polyethylene glycol complex with plasminogen activator function. – J. Clin. Invest. 75: 413-419.

Reed, G.L., Hong, A.K., Liu, L., Parhami-Seren, B., Matsueda, L.H., Wang, S. and Hedstrom, L. 1999. A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8879-8883.

Roberts, M.J., Bentley, M.D. and Harris, J.M. 2002. Chemistry for peptide and protein PEGylation. – Adv. Drug. Deliv. Rev. 54: 459-476.

Rother, J., Ford, G.A. and Thijs, N.S. 2013. Thrombolytics in acute ischaemic stroke: historical perspective and future opportunities. – Cerebrovasc. Dis. 35: 313-319.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning, a laboratory manual. – CSHL Press.

Sikri, N. and Bardia, A. 2007. History of streptokinase use in acute myocardial infarction. – Tex. Heart. Inst. J. 34: 318-327.

Scott, M. 1995. Cysteine-pegylated proteins. – USA Patent Number: 5766897.

Shani, G., kumar, R., Roy, C., Rajagopal, K., Nihalani, D., Sundram, V. and Yadav, M. 2007. Nucleic acid molecules encoding clot specific streptokinase fusion proteins processing altered plasminogen activation characteristics. – USA Patent Number: 7250503 B2.

Vellanki, R.N., Potumarthi, R., Doddapaneni, K.K., Anubrolu, N. and Mangamoori, L.N. 2013. Constitutive optimized production of streptokinase in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter of *Pichia pastoris*. – BioMed. Res. Int. 2013: 249-268.

Veronese, F.M. 2001. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. – Biomat. 22: 405-417.

Werner, M.H., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Kondoh, A. and Fisher, R.J. 1994. Refolding proteins by gel filtration chromatography. – FEBS Lett. 345: 125-130.

Wu, X.C., Ye, R., Duan, Y. and Wong, S.L. 1998. Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in *Bacillus subtilis*: streptokinase with

longer functional half-life. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 824-829.

How to cite this article:

Rezaei, M., Baghban Arani, F and Arabi Mianroodi, R. 2016. Point mutation in amino acid 263 of streptokinase gene as well as cloning and expression of the cysteine containing mutated protein. – Nova Biol. Rep. 3: 249-257

رضائی، م.، باغبانی آرانی، ف. و عربی میانرودی، ر. ۱۳۹۵. ایجاد جهش نقطه‌ای در اسید آمینه ۲۶۳ ژن استرپتوکیناز و کلونینگ و بیان پروتئین جهش یافته حاوی سیستئین. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۴۹-۲۵۷.