ایجاد جهش نقطه‌ای در اسید آمینهٔ ۲۶۳ ژن استرپتوکیناز و کلونینگ و بیان پروتئین جهش‌یافتهٔ حاوی سیستئین

مهسا رضائی[۱]، فهیمه باغبانی‌آرانی[۲] و رضا عربی‌میانرودی[۳*]

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

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم‌زیستی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

[۲]گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم‌زیستی، دانشگاه آزاداسلامی واحد ورامین– پیشوا، ورامین، ایران

[۳]بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران

[*]مسئول مکاتبات: r_arabi@pasteur.ac.ir

چکیده. استرپتوکیناز یکی از شناخته‌شده‌ترین عوامل ترومبولیتیک با مصرف بالینی گسترده است. با وجود این، کاربرد آن به‌دلیل ایمونوژن بودن، ایجاد عوارض هموراژیک و نیمهٔ‌عمر نسبتاً کوتاه، همراه با خطرهایی است. پگیلاسیون اختصاصی بر روی اسیدآمینهٔ سیستئین، تکنیکی مفید جهت کاهش بسیاری از این عوارض است. هدف از مطالعهٔ حاضر، طراحی و تولید مولکول استرپتوکیناز جهش‌یافتهٔ حاوی سیستئین است که برای پگیلاسیون اختصاصی قابل‌استفاده باشد. اسیدگلوتامیک ۲۶۳ استرپتوکیناز، که یک اسیدآمینهٔ سطحی در ساختار پروتئین استرپتوکیناز است، برای انجام جهش و تعویض با سیستئین انتخاب‌شد. برای نیل به این هدف، با به‌کارگیری روش SOEing PCR، جهش بر روی کدون GLU263 ژن استرپتوکیناز برای تبدیل به کدون سیستئین انجام شد. سپس، ژن استرپتوکیناز دست‌نخورده و جهش‌یافته در وکتور بیانی pET-26b (+) وارد شدند. ساختارهای حاصل درون *اشریشیا کلی* Rosetta (DE3) ترنسفرم شده و توسط القا با IPTG بیان شدند. درنهایت، تولید پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ آزمون‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تأیید شد. پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ افینیتی کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA agarose در شرایط دناتوره با اوره تخلیص شدند و برای حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها از فیلتراسیون ژلی با سفادکس G-25 استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از وکتور و میزبان مذکور ژن جهش‌یافتهٔ حاوی کدون سیستئین به‌خوبی بیان می‌شود و برای پگیلاسیون اختصاصی مناسب خواهد بود.

واژه‌های کلیدی. ترومبولیتیک، پگیلاسیون، 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 Rezaei[1], Fahimeh Baghbani Arani[2] & Reza Arabi Mianroodi[3*]

Received 15.02.2016 / Accepted 04.09.2016/ Published 20.12.2016

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

[2]Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

[3]Research 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 می‌تواند موجب تشکیل لخته در گردش خون یا ترومبوز شود. ترومبوز باعث مسدودشدن رگ‌ها و منجربه بروز سکته‌های مغزی، قلبی، آمبولی ریوی و حتی مرگ می‌شود. در چنین وضعیتی تجویز درون‌رگی عوامل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]

ترومبولیتیک می‌تواند بیمار را از مرگ یا عوارض ناشی‌از سکته نجات‌دهد (Baruah *et al.*, 2005; Collen, 1990; Ghosh *et al.*, 2012). این عوامل دارویی با فعال‌کردن پلاسمینوژن و تبدیل آن به پلاسمین، لختهٔ تشکیل‌شده را حل می‌کنند، به‌همین دلیل به این داروها، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن نیز گفته می‌شود (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Del Zoppo, 2010). از مهم‌ترین داروهای ترومبولیتیک می‌توان به استرپتوکیناز (SK) و فعال‌کنندهٔ پلاسمینوژن بافتی (tPA) اشاره‌کرد. مطالعات وسیعی با هدف مقایسهٔ کارایی کلینیکی استرپتوکیناز و tPA انجام شده‌است، اما این بررسی‌ها به‌طورکلی برتری خاصی را در استفاده از این دو دارو در مقایسه بایکدیگر نشان نداده‌است. ازسوی دیگر، اختلاف درخور توجهی بین هزینهٔ تولید و درمان با این دو دارو وجود دارد، به‌طوری‌که هزینهٔ تمام شدهٔ درمان با استرپتوکیناز درمقایسه با tPA به‌طور درخور توجهی پایین‌تر است (Banerjee *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2012).

استرپتوکیناز نوعی فعال‌کنندهٔ قوی پلاسمینوژن، با مصرف بالینی گسترده، عاملی ترومبولیتیک است و یکی از نخستین داروهایی است که توانست مجوز FDA را برای درمان سکتهٔ 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 زنجیره‌ای متشکل از ۴۱۴ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون است، که به‌وسیلهٔ گونه‌های مختلفی از استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک متعلق به گروه‌های A، C و G تولید می‌شود (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2012; Pimienta *et al.*, 2007; Rother *et al.*, 2013; Vellanki *et al.*, 2013). کارآیی بالینی و قیمت نسبتاً پایین استرپتوکیناز، سبب‌شده که استرپتوکیناز داروی ترومبولیتیک انتخابی به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه باشد. باوجود این، کاربرد استرپتوکیناز به‌دلیل ایمونوژن بودن، ایجاد عوارض هموراژیک و نیمهٔ‌عمر نسبتاً کوتاه همراه با خطر است (Banerjee *et al.*, 2004; Baruah *et al.*, 2005; Sikri & Bardia, 2007). به‌همین منظور، تحقیقات گسترده‌ای با هدف بهبود ویژگی‌های درمانی و کاهش عوارض جانبی استرپتوکیناز انجام گرفته‌است که ازآن‌جمله می‌توان به ایجاد جهش (Wu *et al.*, 1998)، کوتاه‌کردن (Reed *et al.*, 1999)، استفاده از پروتئین‌های فیوژن یا کایمریک (Shani *et al.*, 2007)، گلیکوزیلاسیون (Pratap *et al.*, 2000) و پگیلاسیون اشاره کرد. پگیلاسیون، تکنیکی مفید جهت افزایش پتانسیل پروتئین‌های دارویی با هدف کاهش ایمنی‌زایی، افزایش نیمهٔ 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 به‌صورت غیراختصاصی و تصادفی روی اسیدآمینه‌های مختلف پروتئین‌ها انجام می‌گرفت. این روش باعث ایجاد مخلوط ناهمگنی از پروتئین‌های پگیله و کاهش فعالیت بیولوژیک پروتئین‌ها می‌شد (Rajagopalan *et al.*, 1985; Scott, 1995). امروزه، پگیلاسیون پروتئین‌ها به‌صورت اختصاصی روی اسیدآمینهٔ سیستئین انجام می‌گیرد. در پگیلاسیون اختصاصی، ازعوامل پلی‌اتیلن گلیکول فعال‌شده‌ای استفاده می‌شود که با گروه SH برهم‌کنش می‌کنند و درواقع با اسیدآمینهٔ سیستئین اتصال کووالانت برقرار می‌کنند (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010). باتوجه به فقدان اسیدآمینهٔ سیستئین در توالی آمینواسیدی استرپتوکیناز، این پروتئین مولکول ایده‌آلی جهت ایجاد آنالوگ‌های سیستئینی و انجام پگیلاسیون اختصاصی است. بااستفاده از تکنیک DNA نوترکیب، می‌توان سیستئین را به‌صورت هدفمند جایگزین اسیدآمینه‌هایی کرد که نقش مهمی در فعالیت یا تاخوردگی و ساختار استرپتوکیناز ندارند؛ به‌طوری‌که جهش سیستئینی حاصل، کم‌ترین تغییر را در فعالیت بیولوژیک پروتئین ایجاد کند. همچنین، به‌دلیل این‌که مولکول پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) موردنظر، برای انجام واکنش به دسترسی به اسیدآمینه‌های سطحی نیاز دارد، اسید آمینهٔ موردنظر برای تعویض، باید از میان اسیدآمینه‌های سطحی انتخاب شود (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010).

Monzavi و همکاران (2010) درباب مولکول استرپتوکیناز مطالعه‌ای صورت دادند که در آن جهش جایگزین اسیدآمینهٔ سیستئین به جای اسیدآمینهٔ سرین ۲۰۸ شد؛ نتایج این مطالعه نشان داد که مولکول استرپتوکیناز نوترکیب جدید، فعالیت بیولوژیک

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]

خود را حفظ کرده‌است اما باوجود نتایج مناسب فعالیت بیولوژیک برای این پروتئین جهش، هیچ گزارشی تاکنون مبنی بر پگیلاسیون روی آن وجود ندارد. در تحقیق گسترده‌تری که توسط Kumar و همکاران (2012) انجام شد، جهش‌های سیستئینی از مولکول-های استرپتوکیناز طراحی و ساخته شدند (جهش‌هایی غیراز تحقیق حاضر) و درنهایت پگیلاسیون اختصاصی روی این مولکول‌های استرپتوکیناز انجام گرفت. نتایج این تحقیق اثبات‌کرد که پگیلاسیون اختصاصی موجب بهبود خصوصیات استرپتوکیناز از-جمله افزایش مقاومت به پروتئولیز، افزایش نیمهٔعمر و کاهش ایمنی‌زایی آن می‌شود. باوجود انجام پگیلاسیون‌های متعدد، تاکنون داروی استرپتوکیناز پگیله در بازار دارویی دنیا وجود نداشته‌است. هدف‌از مطالعهٔ حاضر، طراحی و تولید مولکول استر-پتوکیناز جهش‌یافتهٔ جدید حاوی سیستئین (به‌غیر از جهش‌هایی که محققان دیگر ایجاد کرده‌اند) است که برای پگیلاسیون اختصاصی قابل‌استفاده باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب اسیدآمینه برای تعویض

بااستفاده از توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین استرپتوکیناز، که در پایگاه اطلاعاتی Protein Databank (www.pdb.org) موجود است و با به‌کارگیری نرم‌افزار SPDB viewer (version 4.01)، ساختار سه‌بعدی پروتئین استرپتوکیناز تحت بررسی قرار گرفت و اسید آمینه‌های سطحی آن به‌وسیلهٔ نرم‌افزار مشخص شد. ساختار پروتئین استرپتوکیناز پس‌از مشخص‌شدن اسیدآمینه‌های سطحی در درون نرم‌افزار مشاهده و بررسی شد. به این منظور، ابتدا اسید آمینه‌های سطحی توسط گزینهٔ دسترسی نرم-افزار مشخص شدند و به‌صورت جداگانه در ساختار پروتئین استرپتوکیناز توسط نرم‌افزار رنگی شدند. سپس، ساختار استرپتوکیناز با پلاسمینوژن در نرم‌افزار کمپلکس شد و به‌صورت چشمی، موقعیت مکانی اسیدآمینه‌های سطحی رنگی‌شده نسبت به جایگاه فعال روی پلاسمینوژن کمپلکس شده (اسید آمینه‌های ۵۴۱ تا ۷۹۱) تحت بررسی قرارگرفت. با این منطق که پگیلاسیون روی اسیدآمینه‌های سطحی، که به‌اندازهٔ کافی از جایگاه فعال دور باشند، کم‌ترین تداخل را برای تشکیل کمپلکس فعال ایجاد خواهدکرد، گلوتامیک‌اسید ۲۶۳ برای جایگزین‌شدن با اسیدآمینهٔ سیستئین انتخاب شد.

جهش و کلونینگ

پرایمرهای رفت و برگشت باکمک نرم‌افزار GENE RUNNER (version 4.0.9 Beta) طراحی و توسط شرکت Bioneer کرهٔ‌جنوبی ساخته‌شدند (جدول ۱). با به‌کارگیری روش PCR و بااستفاده از ژن *skc2* که قبلاً در وکتور pQE30 کلون شده‌بود (Arabi *et al*., 2011)، به‌عنوان الگوی اصلی، ژن استرپتوکیناز تکثیر شد. جهش هدفمند به‌کمک 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 سیستئین، با اعمال یک سیکل دمای واسرشت شدن (۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد)، دمای اتصال (۵۹ درجهٔ سانتی‌گراد) و دمای پلیمریزاسیون (۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد) صورت گرفت. تکثیر قطعات هم‌پوشان که شامل قطعهٔ ۷۸۹ جفت‌بازی (از ابتدای ژن تا جایگاه ۲۶۳) و قطعهٔ ۴۵۳ جفت‌بازی (از جایگاه ۲۶۳ تا انتهای ژن) بود به-ترتیب با استفاده از جفت پرایمرهای (F1, R263) و (F263, R414) انجام‌شد. قطعات هم‌پوشان به‌دست‌آمده، به‌منظور حذف باندهای غیراختصاصی، به‌وسیلهٔ کیت خالص‌سازی DNA (یکتا تجهیز، ایران) از ژل آگارز تخلیص شدند. واکنش SOEing PCR در دو مرحله صورت گرفت: در مرحلهٔ نخست قطعات هم-پوشان با نسبت مولی مساوی با یکدیگر مخلوط‌شدند و واکنش PCR بدون حضور پرایمرها و با اعمال سیکل دمای واسرشت شدن (۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد)، دمای اتصال (۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد) و دمای پلیمریزاسیون (۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد) انجام شد. بلافاصله پس‌از اتمام این مرحله، مخلوط واکنش دوم (شامل آنزیم-polymerase *pfu* DNA و بافر آن، پرایمرهای F1 و R414، dNTP و MgSO4) به میکروتیوب مرحلهٔ نخست افزوده‌شد تا تکثیر قطعهٔ کامل استرپتوکیناز حاوی جهش به‌وسیلهٔ پرایمرهای ابتدا و انتهای ژن کامل، انجام‌گیرد. درنهایت، محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز شده و قطعهٔ موردنظر بااستفاده‌از کیت خالص‌سازی DNA (یکتا تجهیز، ایران) تخلیص‌شد. ژن دست-نخورده و جهش استرپتوکیناز، پس‌از هضم، با آنزیم‌های محدود

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر استرپتوکیناز جهش‌یافته و دست‌نخورده.

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

نام پرایمر	توالی پرایمر
F1	5'-GACGAGACATATGATTGCTGGACCTGAGTG-3'
R414	5'-GACACTCGAGTTTGTCGTTAGGGTTATCAG-3'
F263	5'-CTGGTCTGAATGAATGCATAAACAACACTGAC-3'
R263	5'-CAGGTCAGTGTTGTTTATGCATTCATTCAG-3'

جایگاه شناسایی آنزیم های محدودکننده به‌صورت خط زیر و کدون سیستئین به‌صورت پررنگ نشان داده‌شده‌است.

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

کنندهٔ *Nde*I/*Xho*I (Fermentas, Romania) درون وکتور pET-26b(+) کلون‌شدند (شکل ۱). سازه‌های ژنی حاوی ژن دست‌نخورده و جهش‌یافته که به‌ترتیب pETSK263Cys و pETSK414 نامیده‌شدند، درون سلول‌های مستعد *اشریشیا کلی* سویهٔ DH5α به‌منزلهٔ میزبان کلونینگ ترنسفرم شدند (Sambrook & Russell, 2001). پس‌از غربالگری کلون‌های حاوی وکتور موردنظر در محیط کشت کانامایسین‌دار، تخلیص پلاسمید توسط کیت (یکتاتجهیز، ایران) انجام‌گرفت و کلون‌های حاوی ژن موردنظر به‌وسیلهٔ هضم با آنزیم‌های محدودکننده شناسایی شدند. به‌منظور تأیید نهایی، پلاسمید نوترکیب حاوی استرپتوکیناز جهش‌یافته، برای اطمینان از وجود کدون اسیدآمینهٔ سیستئین در جایگاه ۲۶۳ و فقدان هرگونه جهش نقطه‌ای دیگر، به‌وسیلهٔ شرکت Macrogen کرهٔ‌جنوبی از دوطرف تعیین توالی شد.

بیان و تخلیص پروتئین

به‌منظور بیان پروتئین‌ها، سازه‌های ژنی pETSK263Cys و pETSK414 در سویهٔ بیانی *E.coli* Rosetta ترانسفرم شدند و پس‌از کشت در محیط TY2X القاء بیان پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ IPTG (Sigma, USA) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار صورت‌گرفت و بیان پروتئین‌ها بااستفاده‌از تحلیل SDS-PAGE ارزیابی شد. جهت شناسایی و تأیید قطعی پروتئین‌ها از تکنیک وسترن‌بلات استفاده شد (Sambrook & Russell, 2001). برای این‌منظور، ابتدا باندهای مربوط به پروتئین استرپتوکیناز دست‌نخورده و جهش‌یافته، به غشاء نیتروسلولزی منتقل شده و با استفاده از آنتی‌بادی ضد His-tag به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی کنژوگه با آنزیم HRP به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه، پس‌از افزودن محلول DAB، وجود باندهای اختصاصی استرپتوکیناز دست‌نخورده و جهش‌یافته تحت بررسی قرارگرفت.

خالص‌سازی پروتئین‌های تأییدشده، بااستفاده‌از روش کروماتوگرافی تمایلی با ستون Ni-NTA agarose در شرایط واسرشت با اوره (۸ مولار) انجام گرفت (Arabi *et al.*, 2011). حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها با به‌کارگیری کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی با استفاده از ژل سفادکس G-25 به‌منزلهٔ فاز ثابت و بافر حاوی Tris base (۵۰ mM) و NaCl (۲۵ mM) با pH ۷/۵ به‌عنوان فاز متحرک صورت گرفت.

نتایج

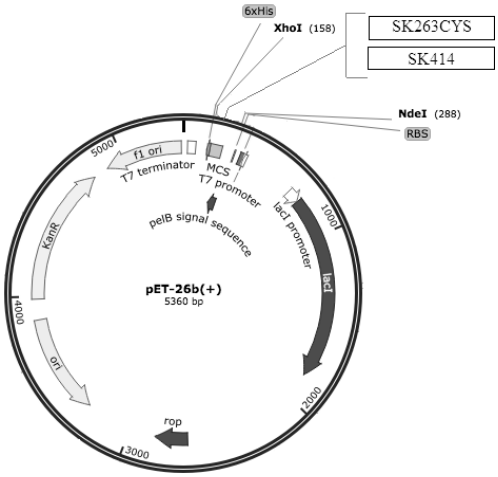
بااستفاده‌از نرم‌افزار SPDB viewer، ساختار سه‌بعدی پروتئین استرپتوکیناز بررسی شد و گلوتامیک‌اسید ۲۶۳، که اسیدآمینه‌ای سطحی است، جهت انجام جهش جایگزینی با اسیدآمینهٔ سیستئین انتخاب شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، اسیدآمینهٔ گلوتامیک‌اسید ۲۶۳ در دمین بتا قراردارد و دارای فاصلهٔ کافی با دمین گاما (که ازلحاظ فضایی به جایگاه کاتالیتیک پلاسمینوژن نزدیک است) است. به‌منظور ایجاد جهش، ابتدا قطعات هم‌پوشان حاوی جهش بااستفاده از جفت پرایمرهای (F1, R263) و (F263, R414) تکثیر شدند (شکل ۳A). پس‌از تخلیص، این قطعات در مرحلهٔ بعدی با کمک روش SOEing PCR هم‌پوشان شدند و قطعهٔ کامل حاوی جهش ایجاد شد (شکل ۳B). درنهایت ایجاد جهش در مکان موردنظر با استفاده‌از روش تعیین توالی به تأیید رسید (شکل ۴). ژن دست‌نخورده و جهش‌یافتهٔ استرپتوکیناز،

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

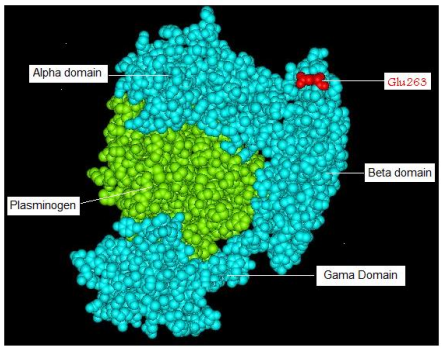
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]



شکل ۱– نمایی شماتیک از وکتور pET-26b و جایگاه ورود ژن استرپتوکیناز. ژن‌های دست‌نخورده و جهش‌یافته استرپتوکیناز از طریق جایگاه‌های برش آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I 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 *Nde*I and *Xho*I restriction sites.



شکل ۲– ساختار کمپلکس استرپتوکیناز– پلاسمینوژن.

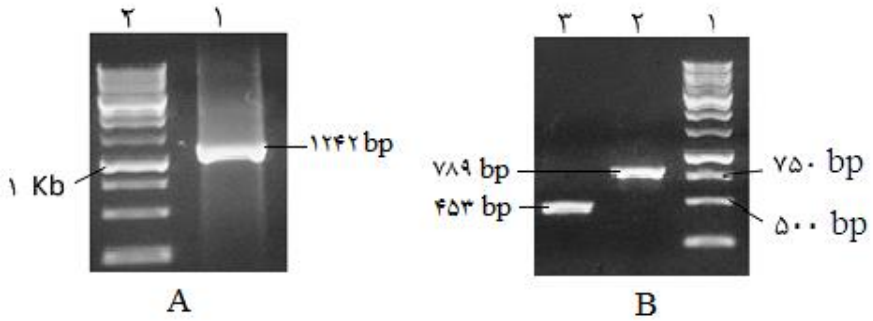
Fig. 2. Structure of streptokinase-plasminogen complex.

در جایگاه *Nde*I/*Xho*I وکتور pET-26b(+) کلون‌شد و سازه‌های ژنی حاصل به‌نام‌های pETSK263Cys و pETSK414 درون باکتری *E.coli* DH5α ترنسفرم شدند. بااستفاده‌از هضم آنزیمی، کلونینگ ژن دست‌نخورده و جهش‌یافتهٔ استرپتوکیناز در وکتور pET-26b(+) موردتأیید قرارگرفت و تعیین توالی مجدد ژن در سازهٔ pETSK263Cys، ایجاد جهش در نقطهٔ موردنظر (جایگاه ۲۶۳) و فقدان هرگونه جهش نقطه‌ای دیگر را تأییدکرد. به‌منظور بیان پروتئین‌های دست‌نخورده و جهش‌یافته، سازه‌های به‌دست‌آمده درون *E.coli* Bl21 (DE3) ترنسفرم شدند و تولید پروتئین‌ها بااستفاده از IPTG القاء شد. پس‌از بررسی سلول‌های القا شده به‌روش SDS-PAGE، هیچ باند پروتئینی ۴۷ کیلودالتونی روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (درمقایسه با نمونهٔ القاءنشده) مشاهده‌نشد (نتایج نشان داده نشده‌اند). ازاین رو، سازه‌ها درون میزبان بیانی *E.coli* Rosetta (DE3) ترانسفرم شدند و بیان پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان موردبررسی قرارگرفت. این‌بار نتایج حاصل‌از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل آمید نشان‌داد که هم پروتئین دست‌نخورده و هم پروتئین جهش‌یافته به‌طور کاملاً آشکار درمقایسه با نمونهٔ القانشده، 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 درشرایط واسرشت با درجهٔ خلوص بیش‌از ۹۰ درصد خالص شدند. به‌منظور تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها و حذف اورهٔ مورداستفاده در مراحل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

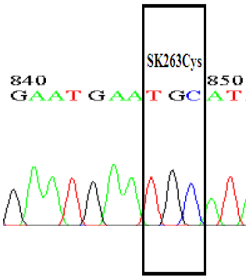
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز. **A:** تکثیر قطعات هم‌پوشان حاوی جهش؛ ستون ۱، مارکر 1kb(SM0313) شرکت فرمنتاس؛ ستون ۲، قطعه ۷۸۹ جفت‌بازی؛ ستون ۳، قطعه ۴۵۳ جفت‌بازی. **B:** تکثیر ژن استرپتوکیناز جهش؛ ستون۱، 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 ٤- توالی نوکلئوتیدی آنالوگ سیستئینی SK263Cys که کدون سیستئین در آن مشخص شده است.

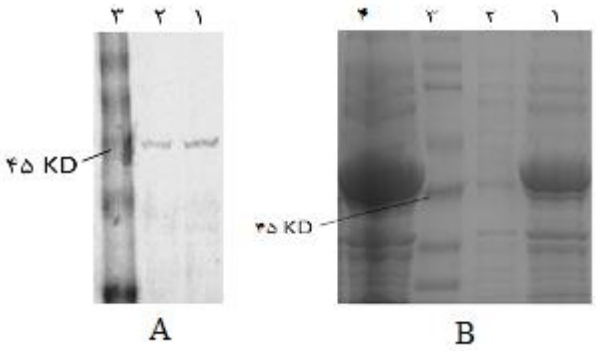
Fig. 4. Nucleotide sequence of cysteine analogue SK263Cys that cysteine codon is distinct in it.

تخلیص، که می‌توانست موجب واسرشت شدن و غیرفعال‌شدن پروتئین‌ها شود، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی انجام گرفت. نمودارهای حاصل‌از فیلتراسیون ژلی پروتئین استرپتوکیناز دست نخورده و جهش بااستفاده‌از ستون سفادکس G-25، نشان‌دهندهٔ خروج اوره از محلول‌های پروتئینی بود (شکل ۶). محلول‌های پروتئینی پس‌از تعویض بافر، فاقد هرگونه رسوب و تجمع پروتئینی بود. اما نتایج غلظت‌سنجی نشان‌داد که محلول‌های پروتئینی تقریباً دوونیم برابر رقیق شده‌اند.

بحث

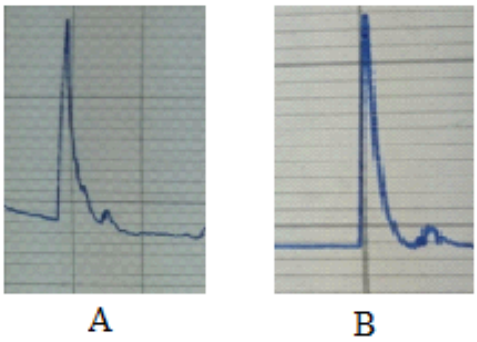
یکی از مهم‌ترین روش‌های بهینه‌سازی استرپتوکیناز، پگیلاسیون اختصاصی روی اسیدآمینهٔ سیستئین است. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که درصورت توجه به ویژگی‌های ساختاری و عمل‌کردی پروتئین استرپتوکیناز، می‌توان باحفظ فعالیت بیولوژیک به مولکول استرپتوکیناز جهش‌یافتهٔ حاوی سیستئین دست‌یافت (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010). برهمین‌اساس، در مطالعهٔ حاضر تلاش شده است تا با طراحی و ساخت استرپتوکیناز جهش جدید حاوی سیستئین (به غیر از جهش‌هایی که محققان دیگر ایجاد کرده‌اند)، امکان انجام پگیلاسیون اختصاصی روی این پروتئین دارویی در ایران فراهم شود. جهت تعیین جایگاه جهش، همانند مطالعات مشابه (Kumar *et al.*, 2012; Monzavi *et al.*, 2010) مواردی همچون دردسترس‌بودن و سطحی‌بودن اسیدآمینهٔ انتخابی و دوربودن آن از جایگاه فعال پروتئین پلاسمینوژن درنظر گرفته‌شد و باتوجه به نتایج ارزیابی‌های کامپیوتری اسیدآمینهٔ گلوتامیک‌اسید در جایگاه ۲۶۳، به‌منظور جایگزینی با اسیدآمینهٔ سیستئین انتخاب شد. بررسی ساختاری استرپتوکیناز به‌صورت چشمی در نرم‌افزار SPDB viewer نشان‌داد که اسیدآمینهٔ انتخاب‌شده هم سطحی بوده و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]



شکل ۵- A: تحلیل SDS PAGE پروتئین دست‌نخورده و جهش‌یافتهٔ استرپتوکیناز؛ ستون ۱، باند پروتئینی مربوط به استرپتوکیناز دست‌نخورده؛ ستون ۲، نمونه القاءنشدهٔ 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 ٦- 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 به‌دلیل کوچک‌تربودن از درون منافذ ذرات ژل عبور کرده و به‌همین دلیل دیرتر از ستون خارج می‌شوند اما پروتئین استرپتوکیناز به‌دلیل بزرگ بودن از لابلای 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.

به‌احتمال زیاد پس‌از پگیلاسیون تداخلی در ایجاد کمپلکس با پلاسمینوژن ایجاد نخواهدکرد. گفتنی است که در هیچ‌یک از مطالعات پیشین، اسید آمینهٔ گلوتامیک‌اسید ۲۶۳ جهت تعویض با اسیدآمینهٔ سیستئین استفاده نشده‌است. نتایج حاصل‌از الکتروفورز پروتئین‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید نشان‌داد که پروتئین‌ها در سویهٔ *E.coli* Bl21 (DE3) بیان نشده‌اند و یا به‌مقدار کم بیان‌شده که با روش الکتروفورز قابل ردیابی نبودند. در مطالعهٔ دیگری که با-هدف مقایسهٔ میزان بیان پروتئین‌ها در سویه‌های *E.coli* Rosetta (DE3) و *E.coli* Bl21 (DE3) انجام‌گرفته بود، نشان داده‌شد که سویهٔ *E.coli* Rosetta (DE3) موجب افزایش بیان پروتئین‌ها می‌شود. علت این مسئله، می‌تواند متفاوت‌بودن کد اسیدآمینه‌های مورداستفاده در این دو سویه باشد؛ به‌این معنی که احتمالاً سویهٔ Rosetta به‌دلیل دارابودن t-RNAهای کمیاب، موجب بیان کدون‌هایی می‌شود که به‌ندرت 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 نشان‌داد که بااستفاده‌از سویهٔ *E.coli* Rosetta (DE3) بیان پروتئین‌ها به-میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. یکی‌از مهم‌ترین مراحل تولید

پروتئین نوترکیب خالص‌سازی آن است. هرچه مراحل تخلیص کمتر باشد، بازده تولید پروتئین بالاتر است. پروتئین‌های استرپتوکیناز تولیدشده در این مطالعه، به‌واسطهٔ داشتن برچسب هیستیدینی (6xHis-tag) قابلیت تخلیص بااستفاده‌از روش کروماتوگرافی‌تمایلی با ستون Ni-NTA agarose را دارا بودند. باتوجه به این‌که بیان بالای پروتئین‌ها در باکتری *E.coli* می‌تواند موجب تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت نامحلول و تشکیل اجسام توده‌ای شود (Werner *et al.*, 1994)؛ احتمال داشت که تخلیص پروتئین‌ها در شرایط واسرشت‌نشده، موجب کاهش بازده تخلیص شود (Bornhorst & Falke, 2000). بنابراین، خالص‌سازی پروتئین‌ها در شرایط واسرشت با اوره انجام گرفت تا پروتئین‌ها به‌صورت محلول درآیند و تخلیص آنها تسهیل شود. پس‌از تخلیص با این روش، از فیلتراسیون ژلی جهت حذف اوره و تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها استفاده شد. از مزایای این روش نسبت‌به روش استفاده از کیسهٔ دیالیز می‌توان به ساده‌تر بودن، کوتاه‌تر بودن ازلحاظ زمانی و درصد بیشتر ساختار درست پروتئین اشاره کرد. علاوه‌براین، پروتئین‌ها پس‌از انجام فیلتراسیون ژلی احتمالاً کمی خالص‌تر نیز می‌شوند. تنها ایراد این روش، رقیق‌شدن پروتئین‌ها پس‌از تعویض بافر است که در این مطالعه نیز مشاهده‌شد که پروتئین‌ها حدود ۲/۵ برابر رقیق شده‌اند. اما برخلاف دیالیز، در فیلتراسیون ژلی احتمال جمع‌شدن و تاخوردگی نامناسب پروتئین‌ها، کم است. نمودارهای به‌دست‌آمده از فیلتراسیون ژلی پروتئین استرپتوکیناز دست‌نخورده و جهش، گواه بر خروج اوره از نمونه‌ها بوده و محلول‌های پروتئینی حاصل، کاملاً شفاف و بدون هیچ رسوب پروتئینی حاصل‌از جمع‌شدن مشاهده‌شد که این نتایج مطابق با مطالعات پیشین (Werner *et al.*, 1994) است. نتایج حاصل‌از این تحقیق منجربه ساخت سازهٔ ژنی و سویه‌ای نوترکیب با قابلیت تولید پروتئین جهش‌یافته با بازده مناسب شدکه دارای اسید آمینهٔ سیستئین به‌جای اسیدگلوتامیک ۲۶۳ است. نظربه این‌که پروتئین جهش‌یافته یادآوری شده حاوی اسیدآمینهٔ سیستئین در سطح مولکول است، درصورت اثبات عدم کاهش فعالیت بیولوژیک، انتخاب ایده‌آلی برای انجام پگیلاسیون اختصاصی در پروژه‌های آتی خواهد بود.

سپاسگزاری

هزینه‌های مالی این تحقیق، که قسمتی از طرح ۷۰۱ است، از بودجهٔ پژوهشی انستیتو پاستور ایران تأمین شده‌است. بدین‌وسیله از حمایت‌های دکتر آقاصادقی رییس بخش هپاتیت 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. – Vascul. 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-Aminolevulinate 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 Roohhvand, 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, JC., Rodríguez, C., Ramos, A., Mellaert, 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]

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 mutein streptokinase from overproduction in *Escherichia coli* Bl-21 and study on the fibrinolityc 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., Houng, A.K., Liu, L., Parhami-Seren, B., Matsueda, L.H., Wang, S. and Hedstrom, L. 1999. A ca-talytic 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 proccessing 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 cere*visiae 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., Baghbani 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 آمینهٔ ۲۶۳ ژن استرپتوکیناز و کلونینگ و بیان پروتئین جهش‌یافتهٔ حاوی سیستئین. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۵۷-۲۴۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.3.8.6]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.3.258]