بنام خدا

کلونینگ ژن استرپتوکیناز *استرپتوکوکوس پایوژنز* در *E.coli*

الهام سیاسی *[1]، فاطمه فخر فاطمی [2]، میترا صالحی [3] .

۱- گروه میکروبیولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.

تلفن : ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶ - Email: emi_biotech2006@yahoo.ca

۲- گروه بیوتکنولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.

تلفن : ۰۹۱۲۸۲۴۱۰۶۲– Email: fatemeh.fakhrefatemi@gmail.com.

۳- گروه میکروبیولوژی- دانشکده علوم زیستی- دانشگاه آزاد اسلامی – واحد تهران شمال – تهران – ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۳۲۱۱۷۹۴ - Email: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com .

*نویسنده مسئول : الهام سیاسی - آدرس محل کار: میدان هروی – خیابان مکران جنوبی – بوستان دهم – دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت). تلفن : ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶- نمابر : ۰۲۱۲۲۹۲۴۸۳۳ - ایمیل : emi_biotech2006@yahoo.ca

Cloning of *Streptococcus pyogenes* streptokinase gene in *E.coli*

Elham Siasi *[1], Fatemeh Fakhre Fatemi [2] , Mitra Salehi [3].

1- Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel:09124056746- Email: emi_biotech2006@yahoo.ca.

2- Department of Biotechnology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel :09128241062- Email: fatemeh.fakhrefatemi@gmail.com.

3- Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel:09123211794- Email : mitra_salehi_microbiology@yahoo.com.

*Corresponding author : Elham Siasi, Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University- South Makran street- Heravi Square- Tehran- Iran- Tel: 0098-21-22220409 -09124056746 ; Fax: 0098-21-22924833 ; E-mail: emi_biotech2006@yahoo.ca

کلونینگ ژن استرپتوکیناز *استرپتوکوکوس پایوژنز* در *E.coli*

چکیده

سابقه وهدف– استرپتوکیناز به عنوان یک آنزیم ضد لخته خون درون عروق می باشد و از آن در درمان گرفتگی رگ های خونی در پیامدهای همچون سکته های قلبی، مغزی، ریوی و تشکیل لخته خون درون عروق استفاده می شود. اخیرا اهمیت استرپتوکیناز نوترکیب در درمان مشخص شده است. هدف از این تحقیق کلونینگ ژن استرپتوکیناز *استرپتوکوکوس پایوژنز* در *E.coli* بود.

مواد و روش ها – ابتدا ژنوم باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* استخراج شد و PCR برای ژن *ska* انجام شد. برای بررسی اندازه و کیفیت قطعه تکثیر یافته، الکتروفورز روی ژل آگارز صورت گرفت. سپس با کیت TA کلونینگ ژن مورد نظر وارد وکتور PTG19 گردید و پلاسمید نوترکیب حاصل به باکتری *E.coli XL1-Blue* داخل شد. بررسی داده های حاصل از توالی یابی قطعه کلون شده در وکتور و مقیاسه آن با توالی مرجع در بانک اطلاعاتی NCBI ، برای صحت کلونینگ این ژن انجام شد.

یافته ها– نتایج نشان داد که محصول PCR ژن *ska* با طول bp ۵۱۳ بود. این ژن اولین بار با استفاده از تکنیک TA کلونینگ در وکتور PTG19 و سلول میزبان *E.coli XL1Blue* کلون گردید. نتایج تعیین توالی قطعه کلون شده نشان دهنده حضور ژن *ska* *کد کننده استرپتوکیناز* بود.

بحث – ژن *ska* تکثیر شد و با انجام تکنیک TA کلونینگ در وکتور PTG19 و سلول میزبان *E.coli XL1Blue* ، صحت کلونینگ مورد تایید قرار گرفت.

کلمات کلیدی : استرپتوکیناز، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، ژن *ska* ، *کلونینگ*، *E.coli XL1Blu*

Cloning of *Streptococcus pyogenes* streptokinase gene in *E.coli*

Abstract

Aim and Background: Streptokinase is a thrombolytic medication and enzyme and is used to break down clots in some cases of myocardial infarction (heart attack), pulmonary embolism, and arterial thromboembolism. Recently recombinant streptokinase is important for treatment. In this research, was studied cloning of *Streptococcus pyogenes* streptokinase gene in *E.coli*.

Materials and methods: At the first, genome of the bacteria was extracted and used PCR for *ska* gene. Then agarose gel electrophoresis was performed for detection of size and quality of the resulting amplicons. Then by TA Cloning kit, the target gene was inserted in to the PTG19 Cloning vector and the recombinant plasmid was inserted in to the *E.coli XL1Blue* bacteria. Checking the sequencing data obtained from cloned gene in the vectore compared with the refrenece sequenece obtained from the NCBI database, was confirmed the success of the gene cloning.

Results: The results showed that PCR product is *ska* gene with length 513 bp. This is for the first time that the *ska* gene was cloned by the TA Cloning in the PTG19 vector and the *E.coli XL1Blue* host cell. The results of sequencing was confirmed presence of *Streptokinase* gene, *ska.*

Conclusion: The *ska* gene was amplified and its correct and effective cloning was confirmed by TA Cloning with PTG19 vector and *E.coli XL1Blue* host cell.

Key words: Cloning, *E.coli XL1Blue*, *ska* gene, *Streptococcus pyogenes*, Streptokinase.

کلونینگ ژن استرپتوکیناز *استرپتوکوکوس پایوژنز* در *E.coli*

مقدمه

استرپتوکیناز یکی از انواع پروتئین نوترکیب محسوب می شود که به عنوان داروی ضد لخته خون کاربرد دارد. وجود نقص درسیستم ایمنی هموستازی و تشکیل لخته درون عروق می تواند باعث بسته شدن رگ و ایجاد یک سری پیامدهای منجر به مرگ همچون سکته های قلبی، مغزی، ریوی و گرفتگی رگ های عمقی گردد (۱). آمار تلفات ناشی از آن در جهان سالی ۱/۵ تا ۲ میلیون نفر است که مقام دوم پس از تصادفات را دارد (۲). لخته های خون با استفاده از داروهای فعال کننده سیستم فیبرینولیز فیزیولوژیک که به درمان ترومبولیتیک معروف است حل می شوند (۳). داروهایی که به عنوان عوامل ترومبولیتیک هستند عبارتند از: استرپتوکیناز، یوروکیناز، کمپلکس فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (آنی استریلاز، امیناز)، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی و عوامل دیگری چون استافیلوکیناز در مراحل بررسی انجام آزمایش می باشند (۵ ، ۴). از معمول ترین و قدیمی ترین داروهای ترومبولیتیک استرپتوکیناز می باشد ولی مشکلات ناشی از ایمنی زایی و به وجود آمدن آنتی استرپتوکیناز را همراه دارد (۳). تولید پروتئین استرپتوکیناز از دو روش، تولید با میکروارگانیسم های تولید کننده استرپتوکیناز و تولید با روش های بیوتکنولوژی به عنوان پروتئین نوترکیب امکان پذیر است. اولین تحقیقات بر روی این داروی درمانی و سیستمیک فیبرینولیتیک در سال ۱۹۳۳ توسط گرنری و تالت صورت گرفت و آن ها توانستند از کشت فیلتر شده باکتریهای *استرپتوکوکی* بتا همولیتیک گروه C، نوعی پروتئین خارج سلولی که فعال کننده پلاسمینوژن است را استخراج کنند که باعث لیز شدن لخته خون انسان می شود. بیشتر استرپتوکینازها از *استرپتوکوکوس* های بتا همولیتیک گروه های A, C, G لانسفیلد بدست آمده اند که گروه C *استرپتوکوکی* به دلیل فقدان توکسین های تب زا برای تولید استرپتوکیناز ترجیح داده شده است. با توجه به تولید استرپتوکیناز توسط میکروارگانیسم ها، تحقیق بر روی استرپتوکیناز به عنوان یک داروی ترومبولیتیک کم هزینه و قابل دسترس برای بیماران کم درآمد و در سیستم بهداشتی کشور های فاقد پشتوانه مالی قوی، مطرح است (۶). اهمیت تولید نوترکیب این پروتئین، به دلیل کمی میزان پروتئین ترشح شده توسط سوش های *استرپتوکوک* و پاتوژن بودن آن مهم است. در ضمن استفاده از استرپتوکیناز طبیعی برای درمان موثر ترمبوز بدون خطر نیست. لذا با کلون سازی ژن استرپتوکیناز در میکروارگانیسم های غیربیماری زا، استرپتوکیناز نوترکیبی تولید می شود، که خطرات احتمالی تلقیح به بیماران و پتانسیل عفونت کارکنان با *استرپتوکوک* را محدود می سازد (۷). ژنوم *استرپتوکوک* دارای توالی های کد کننده برای پروتئین استرپتوکیناز وپروتئین غنی از لوسین بوده که این دو توالی توسط یک خمیدگی ۳۲۸ جفت بازی غنی از AT از هم جدا می شوند. این ژن سه نوع پلی پپتید تک زنجیره ای با وزن های ۳۰، ۴۵ ،۴۷ کیلودالتون را بیان می کند. نوع ۴۷ کیلودالتون آن، در فعال سازی پلاسمینوژن بیشترین نقش را دارد (۸). تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب شامل تولید پروتئین هایی است که به سهولت از منابع طبیعی تخلیص نمی شوند. این روش ایجاد تعداد مشخص و محدودی از اسید امینه های جانشین برای رفع سمیت پروتئین های اصلی را دنبال می کند. روش های تولید پروتئین های نوترکیب به عنوان روش های مورد نیاز و اساسی در علم بیوتکنولوژی امکان تولید بسیاری از مولکول های حیاتی مانند داروها، انسولین و پروتئین های خون، هورمون ها مثل هورمون های رشد و واکسن ها و غیره را فراهم می نماید. برای تولید پروتئین های نوترکیب از تکنیک های کلونینگ استفاده می شود که در آن ژن مورد نظر توسط حامل هایی به نام وکتور درون باکتری های میزبان وارد شده تا به عنوان جزئی از ژن باکتری و به همراه آن تکثیر شده و پروتئین مورد نظر همراه با سایر پروتئین های باکتری بیان گردد. محصولات نوترکیب که با دستکاری های ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف همراه است موجب تحول عظیمی در نوع و تنوع فرآورده های دارویی مورد مصرف شده است. داروهای پروتئینی دارای عملکرد بسیار

اختصاصی هستند. لذا بر روی سایر فرآیندهای بیولوژیک غیر مرتبط اثر سوئی نخواهند گذاشت و از این نظر دارای عوارض جانبی کمتری هستند (۱۰ ، ۹). کلونینگ ژن شامل تولید DNA ی نوترکیب و تکنیک تولید و تخلیص ژن های دلخواه می باشد. یک استراتژی اساسی در کلونینگ جابجا کردن ژن ها از یک ژنوم بزرگ و پیچیده به یک ژنوم ساده وکوچک است. فرایند نوترکیب in vitro، امکان برش قطعات مختلف از DNA توسط یک آنزیم محدود الاثر و اتصال مولکول های DNA به یکدیگر از طریق جفت شدن بازهای مکمل را امکان پذیر می سازد (۹). استرپتوکیناز نوترکیب (خصوصا استرپتوکیناز مهندسی شده) در بین داروهای ترومبولیتیک حائز اهمیت هستند، لذا تحقیق درباره این فراورده امری سودمند خواهد بود و گامی موثر در ایجاد دانش تولید یکی از داروهای ژنریک است که روند مصرف آن با توجه به موارد روز افزون سکته های قلبی مورد اهمیت می باشد. بنابراین هدف این تحقیق اجرای کلونینگ بهتر ژن *ska* از *استرپتوکوکوس پایوژنز* در باکتری *E.coli* بود، تا بتواند در آینده جهت تولید استرپتوکیناز نوترکیب به عنوان ماده دارویی اولیه در درمان بیماران دارای لخته خونی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

۱- کشت باکتری – باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC۱۹۶۱۵* از انسیتو پاستور تهران خریداری گردید. این باکتری به صورت آمپول لیوفیلیزه بود که برای کشت دادن آن طبق مراحل زیر عمل شد. پس از شکستن آمپول در کنار شعله و شرایط استریل حدود ۱ سی سی از محیط TSB (Tryptic Soy Broth) را درون ویال ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس باکتری بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت خطی داده شد. چون *استرپتوکوکوس* ها باکتریهای گرم مثبت و دیر رشد و پرنیاز هستند در محیط بلاد آگار و در شرایط دارای دی اکسید کربن کشت داده شدند.

۲- استخراج DNA باکتری– از کلنی های تازه *استرپتوکوکوس پایوژنز* ۲۴ ساعته برای استخراج ژنوم باکتری استفاده شد و از کیت تجاری پیشگامان انتقال ژن دانشگاه شهید بهشتی برای استخراج ژنوم استفاده شد.

۳-اندازه گیری غلظت DNA - غلظت DNA با طیف سنجی جذبی اشعه ماورا بنفش اندازه گیری شد. جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. زیرا مقدار اشعه ماورا بنفش جذب شده توسط یک محلول با مقدار DNA موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد. در طول موج ۲۶۰ نانومتر، یک واحد جذب معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته ای در هر میلی لیتر است.

۴- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)– برای تکثیر ژن *ska* از نمونه DNA باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC : 19615* استفاده شد. توالی پرایمرها، مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه PCR به ترتیب در جداول ۱ و۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمر های اختصاصی برای تکثیر ژن*ska* .

نام ژن	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده
ska	F: 5´- AAC CTT GCC GAC CCA ACC TGT -3´ R : 5´- GTG AAC AGT TTC AAG TGA CTG CGAT-3´	513 bp

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای PCR با آنزیم Taq DNA پلی مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر

مواد	مقدار(میکرولیتر)
*Master Mix	۱۰
Forward پرایمر	۱
Reverse پرایمر	۱
DNA(ژن مورد نظر)	۴
آب	۴
جمع	۲۰

*Master Mix شامل بافر PCR ، $MgCL_2$ ، dNTPs و Taq DNA پلیمراز بود.

جدول ۳- برنامه زمانی – دمایی دستگاه PCR

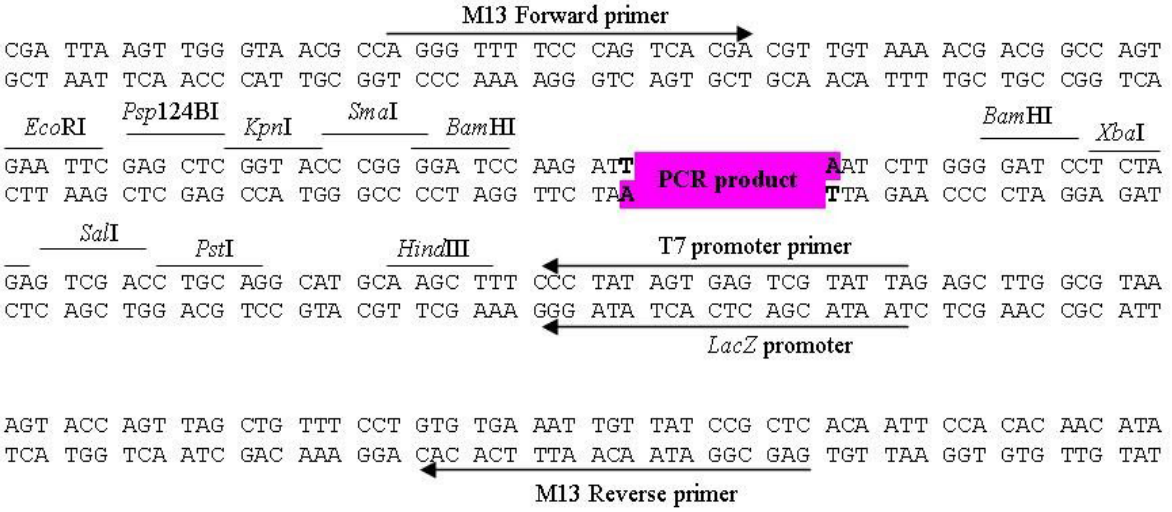
مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان
Denaturation اولیه	۹۵	۳ ثانیه
Denaturation ثانویه	۹۵	۳۰ ثانیه
Annealing	۵۴/۵	۳۰ ثانیه
Extension اولیه	۷۲	۴۵ ثانیه
Extension نهایی	۷۲	۲۵ دقیقه

*مدت زمان کامل : یک ساعت و پنجاه دقیقه می باشد.تعداد دفعات ۳۰ سیکل که شامل ۲۹ بار مکرر به همراه دور اول می باشد.

۵-الکتروفورز برای مشاهده محصول PCR- برای بررسی نتایج واکنش PCR الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام گرفت. سپس نمونه ها با اتیدیوم برامید رنگ آمیزی شد و در دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

۶- کلونینگ محصولات PCR– به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شد. کیت PCR TA-Cloning از شرکت سینا ژن تهیه شد. در این روش از یک وکتور خطی به نام PTG19-T که در انتهای ۳′ آن باز تیمین قرار دارد استفاده شد (این آنزیم فاقد خاصیت Proof reading می باشد). استفاده از وکتور خطی PTG19-

T که در انتهای ´۳ خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد. سپس آنزیمT4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می کند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر است تشکیل شده که توانایی تکثیر خود به خود را در میزبان مناسب مانند *E.coli* دارا می باشد. در این روش نیاز به مرحله هضم آنزیمی نبود و این مرحله حذف شد. این وکتور به علاوه دارای ژن LacZ به منظور غربال گری سفید/آبی، پرایمر M13 برای PCR و توالی یابی، و آنزیم محدود کننده BamH1 بود. توالی MCS (Multiple cloning sites) و پرایمرهای چپ و راست M13 در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل۱- توالی MCS وکتور کلونینگ PTG19 و پرایمرهای M13

۷-اتصال محصول PCR در وکتور کلونینگ PTG19-T (Ligation) - مرحله Ligation با مواد جدول ۴ انجام شد. مجموعه مواد در یک ویال ۰/۲ ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد که برای این منظور از دستگاه hot plate استفاده شد.

جدول ۴- مواد مورد نیاز جهت انجام مرحله Ligation

ماده	مقدار (میکرولیتر)
وکتور کلونینگ PTG19-T	۲
آنزیم T4 Ligase	۱
بافر	۱
محصول PCR	۱/۵
آب	۴/۵

جمع	۱۰

۸- انتقال وکتور به میزبان E.coli XL1-Blue

۸-۱-آماده کردن محیط های کشت باکتری (مایع و جامد)- برای تهیه محیط کشت مایع ۲۵ گرم از پودر محیط کشت LB Broth را در یک لیتر آب مقطر حل شد و برای تهیه محیط کشت جامد ۲۵ گرم از پودر محیط کشت LB Broth همراه با ۱۵ گرم پودر آگار در یک لیتر آب مقطر حل شد.

۸-۲- آماده کردن سلول های باکتریایی پذیرنده وکتور- باکتری *E.coli* سویه *XL1Blue* که از دانشگاه تهران تهیه شد، در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت۱۲ ساعت کشت داده شد و سپس در دستگاه سانتریفوژ لوله ای به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۶۰۰ سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری به دست آمد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر s به رسوب باکتری اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن محتویات به یک ویال ۱/۵ انتقال داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرارداده شد. سپس به مدت ۱ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار در دور g ۶۰۰۰ قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از بافر s روی رسوب ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار داده شد. (در اثر شوک دمایی دیواره باکتری تضعیف شد). دوباره در دور g ۶۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد، این بار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر s روی رسوب ریخته شد و پیپتاژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به محلول Ligation اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. سپس ۹۰ ثانیه آن را در ۴۲ درجه سانتی گراد و دوباره ۱۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. می توان آن ها را در حجم دلخواه (معمولا ۷۵ میکرولیتر) در تیوب های ۱/۵ میلی لیتری در پیچ دار مخصوص ذخیره و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد به صورت بلند مدت نگه داری کرد.

۸-۳-نحوه ورود وکتور به باکتری های پذیرنده وکتور (ترنسفرمیشن)- ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ساخته شده بر داشته شد و در ویال ۱/۵ ریخته شد، مواد انتقال داده شده که در یخ قرار داشت به آن اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن به مدت ۶۰-۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به محیط کشت آنتی بیوتیک آمپی سیلین اضافه شد تا باکتری بتواند در محیط رشد کند و وکتوری که دریافت کرده را نگه دارد. سپس محتویات به مدت ۱ دقیقه در دور g۶۵۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری روی پلیت LB کشت داده شد و به مدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در نهایت انجام کلونینگ تایید شد.

۹-تایید صحت کلونینگ- به منظور تایید کلونینگ سه مرحله انجام شد.

۹-۱- غربالگری کلنی های سفید از کلنی های آبی از رشد باکتری کلون شده بر روی محیط کشت LB – برای این منظور نمونه هایی از باکتری کلون شده بر روی محیط کشت LB حاوی X-gal(20mg/ml) به مقدار ۸۰ میکرولیتر، IPTG (100mM) به مقدار ۸۰ میکرولیتر و آنتی بیوتیک آمپی سیلین به مقدار ۵۰ میکرولیتر کشت داده شدند. (وکتور کلونینگ در این روش PTG19-T دارای ژن LacZ بود، چون MCS وسط LacZ قرار داشت اگر قطعه ای وارد وکتور می شد ژن LacZ تخریب می گشت و آنزیم بتا گالاکتوزیداز غیرفعال می شد. در نتیجه باکتری نمی توانست از X-gal استفاده کند و کلنی های سفید در محیط کشت تشکیل می شد. به علاوه چون محیط دارای آمپی سیلین بود، کلنی هایی می توانستند در محیط رشد کنند که پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین را دریافت نموده بودند).

۲-۹- انجام PCR با پرایمر ژن *ska*– برای بررسی کلونینگ صحیح ژن مورد نظر در باکتری *E.coli*، با واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر، حضور ژن *ska* در باکتری پذیرنده بررسی شد.

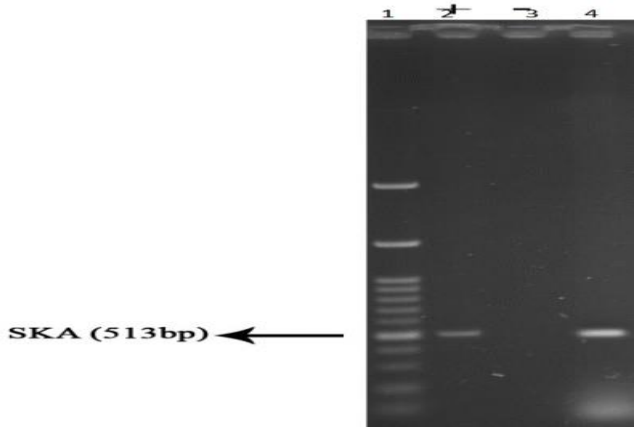
۳-۹- تایید ورود ژنوم باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* به داخل وکتور- برای این منظور واکنش PCR با پرایمر وکتور (پرایمر M13) برای ژنوم باکتری میزبان انجام شد. سپس توالی محصول PCR جهت تایید ورود ژنوم باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* به داخل وکتور تعیین توالی گردید و با توالی ژنومی ژن *ska*، در NCBI مقایسه شد (Blast nucleotid).

نتایج

۱-رشد باکتری– رشد باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC:19615* لیوفلیزه، با کشت خطی بر روی محیط کشت بلاد آگار در مجاورت دی اکسید کربن مشاهده شد. سویه های رشد یافته دارای همولیز هستند و همولیز ایجاد شده بر روی بلاد آگار نشانه تایید حضور آن ها بود.

۲-تایید نمونه DNA خالص استخراج شده– نسبت جذب نمونه DNA استخراج شده با طیف سنجی جذبی اشعه ماورا بنفش در ۲۶۰ نانومتر برابر ۱/۸ بود (که نشان دهنده نسبت غلظت DNA خالص است).

۳- نتایج الکتروفورز برای مشاهده محصول PCR- نتیجه الکتروفورز بر روی ژل آگارز جهت مشاهده محصول PCR انجام گرفت و تصویر باند حاصل از تکثیر ژن *ska* *استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC:19615* در شکل ۲ آورده شده است.



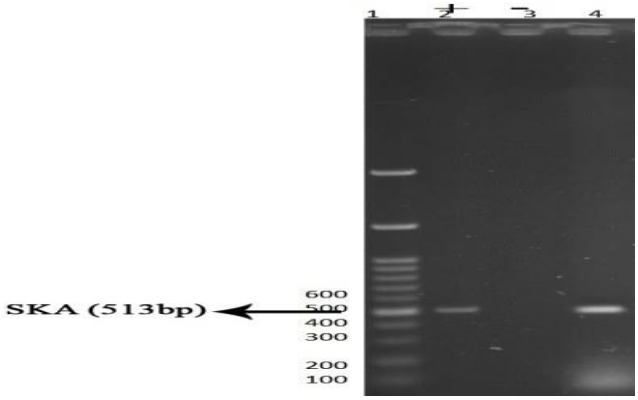
شکل ۲- باند حاصل از تکثیر ژن *ska*/*استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC:19615*

از چپ به راست به ترتیب- ستون ۱: مارکر مولکولی bp ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون۳: کنترل منفی، ستون۴: باند تکثیر شده ژن *ska* (۵۱۳ bp).

۴-نتایج تایید صحت مراحل کلونینگ- جهت تایید کلونینگ پس از انجام مراحل Ligation و Transformation، باکتری *E.coli* سویه *XL1Blue* (پذیرنده وکتور PTG19-T) از سه جنبه بررسی شد.

۴-۱- نتایج کشت روی محیط LB- باکتری روی پلیت محیط کشت LB آگار دارای X-gal ۸۰، IPTG و آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد و کلنی های سفید همراه کلنی های آبی تشکیل شد که نشان دهنده تخریب ژن LacZ و موفقیت کلون ژن مورد نظر بود. به علاوه کلنی های رشد یافته در محیط نشانگر نمونه های گیرنده پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین بودند.

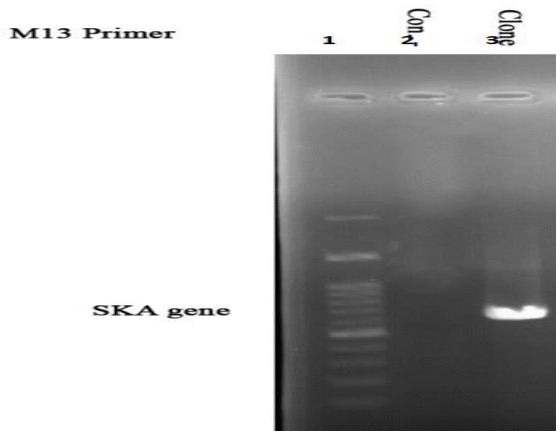
۴-۲-نتایج تکثیر ژن *ska* با پرایمر اختصاصی خود ژن – ژنوم باکتری *E.Coli* استخراج شد و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *ska* برای آن انجام گرفت (مطابق جدول ۱ و ۲ و ۳). پس از انجام الکتروفورز باند حاصل از محصول واکنش PCR با اندازه ژن مورد نظر (*ska*) یکسان مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- باند حاصل از PCR با پرایمر اختصاصی خود ژن

از چپ به راست- ستون۱: مارکر مولکولیbp ۱۰۰ جفت بازی، ستون۲: کنترل مثبت، ستون۳:کنترل منفی، ستون۴: محصول PCR تکثیر ژن *ska* (۵۱۳ bp).

۴-۳-نتایج PCR با پرایمرهای M13 – واکنش PCR با پرایمر های M13 برای ژنوم باکتری *E.coli* کلون شده انجام گرفت. پس از الکتروفورز باند حاصل بیش تر از اندازه باند مربوط به ژن *ska* (۵۱۳bp) مشاهده شد. همچنین نتایج تعیین توالی قطعه کلون شده در وکتور با نرم افزار Mega و blast کردن توالی در سایت NCBI ، نشان داد ژن مورد نظر با موفقیت کلون شده است. نتایج باند حاصل از محصول PCR با پرایمر M13 و نتایج blast توالی کلون شده با ژن *ska* *استرپتوکوکوس پایوژنز*، در NCBI، به ترتیب در شکل های ۴ و ۵ آورده شده است.



شکل ۴- باند حاصل از PCR با پرایمر M13

از چپ به راست- خانه (۱): DNA مارکر (100bp) -خانه (۲): کنترل منفی کلون : القا کلون فاقد وکتور نوترکیب *(E.coli XL1Blue)* - خانه(۳): نمونه مثبت کلون شده (القا کلون واجد وکتور نوترکیب *(E.coli XL1Blue)*(۵۵۵ bp).

Streptococcus pyogenes strain ATCC 19615, complete genome

Sequence ID: CP008926.1Length: 1844804Number of Matches: 1

Range 1: 799717 to 800234GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
929 bits(503)	0.0	513/518(99%)	0/518(0%)	Plus/Plus

```
Query  44      TAACCTTGCCGACCCAACCTGTCCAACAATTTTTGTTAAGGGGACATGTGCGCGTTAGAC  103
               ||||||||| ||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  799717  TAACCTTGCCCACCCAGCCTATCCAACAATTTTTGTTAAGGGGACATGTGCGCGTTAGAC  799776

Query  104     CATATAAAGAAAAACCAATACAAACTCCAGCAAGATCTGTTGATATAAGATATGCTGTAC  163
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  799777  CATATAAAGAAAAACCAATACAAACTCCAGCAAGATCTGTTGATATAAGATATGCTGTAC  799836

Query  164     AGTTTACTCCCTTAAGCCCTGATGATGATTTCACACCAGTTCTCAAAGATACTAAACTAT  223
               |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  799837  AGTTTACTCCCTTAAACCCTGATGATGATTTCACACCAGTTCTCAAAGATACTAAACTAT  799896

Query  224     TGAAAACATTAGCTATCGGCGACACCATCACATCCCAAGAATTACTAGCTCAAGCACAAA  283
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  799897  TGAAAACATTAGCTATCGGCGACACCATCACATCCCAAGAATTACTAGCTCAAGCACAAA  799956

Query  284     GCATTTTAAACGAAAGCTATCCAAATTATACGATTCATGAACGTGACTCCTCAATCGTTA  343
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  799957  GCATTTTAAACGAAAGCTATCCAAATTATACGATTCATGAACGTGACTCCTCAATCGTTA  800016

Query  344     CTCATGACAATGACATTTTCCGTACAATTTTACCAATGGATCAAGAGTTTACTTACCGTG  403
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  800017  CTCATGACAATGACATTTTCCGTACAATTTTACCAATGGATCAAGAGTTTACTTACCGTG  800076
```

Query 404 TCAAAAATCGGGAACAAGCTTATCAAAACGACAATAAAACAGGTCTTAAAAAAGAGACTA 463
Sbjct 800077 TCAAAAATCGGGAACAAGCTTATCAAAACGACAATAAAACAGGTCTTAAAAAAGAGACTA 800136

Query 464 AAAACACCGACCTTATCTCTGAGAAATATTACATCCTTAAAAAAGGGGAAAAGCCGTATG 523
Sbjct 800137 AAAACACCGACCTTATCTCTGAGAAATATTACATCCTTAAAAAAGGGGAAAAGCCGTATG 800196

Query 524 ATCCCTTTGATCGCAGTCACTTGAAACTGTTCACAATC 561
Sbjct 800197 ATCCCTTTGATCGCAGTCACTTGAAACTGTTCACCATC 800234

شکل ۵- نتایج همولوژی توالی قطعه کلون شده با توالی ژن*ska* *استرپتوکوکوس پایوژنز.*

بحث

از بین بردن ترمبوزهای خونی با استفاده از داروهای فعال کننده سیستم فیبرینولیز فیزیولوژیک،که به درمان های ترمبولیتیک معروف هستند، در طول چند دهه گذشته به عنوان درمان برای بیماران مبتلا به این عارضه مطرح بوده و انقلابی را در پزشکی به وجود آورده است و این در حالی است که هنوز هم مرگ و میر ناشی از این بیماری ها علت فوت سالمندان را تشکیل می دهد (۵ ، ۴). یکی از فعال کننده های پلاسمینوژنی که به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرد استرپتوکیناز می باشد که یک پروتئین باکتریایی است که به طور طبیعی در سیستم گردش خون انسان وجود ندارد. این پروتئین ۴۷ کیلودالتونی که از طریق ایجاد کمپلکس دو گانه پلاسمینوژن روند فیبرینولیز را تسریع می کند، به عنوان شناخته شده ترین داروی فیبرینولیتیک مدت مدیدی است علیه بیماری های حاصل از ایجاد لخته های خونی پراکنده در سیستم گردش خون استفاده می شود (۱۱ ، ۶). اولین تجارب کلینیکی با استرپتوکیناز در سالهای دهه ۱۹۶۰ برای درمان ترومبوزهای خونی آغاز و در سال ۱۹۷۶ برای نخستین بار از تزریق درون کرونر آن برای رفع گرفتگی عروق قلبی استفاده شد. هم اکنون استرپتوکیناز بیشترین مطالعات در زمینه داروهای ترمبولیتیک را به خود اختصاص داده است. بنابراین لزوم انجام تحقیق تولید استرپتوکیناز از لحاظ اقتصادی قابل توجیه است. اما ویژگی های ساختاری ساده در این مولکول از جمله وجود نواحی عملکردی مستقل از هم، فقدان اتصالات دی سولفید، فقدان گروههای پروستتیک و مناطق اتصال به کاتیون های دو ظرفیتی و به طور کلی فقدان ساختمان فضایی سوم زمینه لازم را برای دستیابی به انواع متفاوت استرپتوکیناز نوترکیب فراهم ساخته است (۱۲). نکته حائز اهمیت در مورد تولید تجاری استرپتوکیناز مساله ایمنی زیستی است. به این علت که این پروتئین در فرایند تولید همواره برای کارکنان یک عامل ایمونوژنیک به حساب می آید و هرگاه سوش های طبیعی *استرپتوکوکی* برای تولید استرپتوکیناز استفاده شود همواره انجام مراقبت های ایمنی زیستی ضروری خواهد بود، چرا که همه *استرپتوکوکسی* های تولید کننده استرپتوکیناز واجد قدرت بیماری زایی هستند. این امر لزوم استفاده از منابع تولید با ریسک خطر کمتر را با استفاده از فن آوری های نوین توجیه می کند. فهرست پروتئین های انسانی و داروهای تولید شده با روش های نوترکیبی همچنان در حال افزایش است. یکی از دلایلی که در دو دهه اخیر موجب افزایش توجه به بیوتکنولوژی شده، کلون سازی ژن ها می باشد. با وجود این که محصولات مفید بسیاری را می توان از کشت های میکروبی به دست آورد اما این فهرست در گذشته محدود به محصولاتی بود که به طور طبیعی توسط میکروارگانیسم ها تولید می شدند. لذا با این روش امکان تولید بسیاری از مهم ترین مواد دارویی تولید شده توسط موجودات زنده عالی تر که به وسیله میکروب ها تولید نمی شوند، فراهم نبود. این مسئله با ابداع روش کلون سازی ژن ها در بیوتکنولوژی امکان پذیر شد. تکنیک های مهندسی ژنتیک در زمینه بهداشت جهش شگرفی ایجاد کرده است. همچنین بیوتکنولوژی قادر به ساخت داروهای پیچیده ای است که به طریق دیگری نمی توان آنها را تولید کرد. تولید استرپتوکیناز از طریق این چنین تکنیک هایی کمک شایانی در روند بهبودی بیماران

مبتلا به بیماری های قلبی، مغزی کرده است. انواع مختلفی از حامل های کلون سازی مورد نیاز هستند و رسیدن به تولید راضی کننده نیز دشوار است (۴). برای این منظور از سوش کم خطر باکتری *E.coli* با توجه به کارهای مهندسی ژنتیک انجام شده بر روی آن شامل کشف آنزیم های محدود کننده، وجود سیستم های مقاومت به آنتی بیوتیک به عنوان علامتی برای انتخاب سوش های خاص، وجود حامل هایی چون پلاسمیدها و فاژ لامبدا ،موفقیت های حاصله در تولید تجاری پروتئین نوترکیب، به عنوان متداول ترین میزبان باکتریایی مطرح نموده است (۱۳). موفقیت های حاصله از آن باکتری در تولید تجاری استرپتوکینیاز، شاخص های مثبت چون تکثیر سریع، مصرف کم مواد اولیه، کنترل آسان، میزان بالای بیان پروتئین نوترکیب، قدرت بالا برای پذیرش ژن های بیگانه، وجود دانش زیاد در مورد ویژگی های ژنتیکی و بیولوژی مولکولی آن و بلاخره در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقلین همسانه سازی وگونه های میزبانی جهش یافته که آن را به عنوان موجودی بی نظیر و سیار کارامد برای تحقیقات مهندسی ژنتیک و دست ورزی های ژنتیکی مطرح ساخته است (۱۴). لذا در این تحقیق که با هدف کلونینگ بهینه استرپتوکینیاز انجام گرفته است باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* سویه *ATCC19615* در محیط بلاد آگار کشت داده شد. سپس ژن استرپتوکینیاز از این سوش استخراج گردید و برای کلونینگ آن در میزبان *E.coli XLI-Blue* استفاده شد. به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شده است و از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ´۳ خود دارای باز تیمین است و منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد استفاده شد. سپس با آنزیم T4 ligase DNA و تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی امکان پذیرشد که در نتیجه با تشکیل یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر است و توانایی تکثیر خود به خود را در میزبان مناسب را دارد کلونینگ انجام گرفت. در این روش به منظور ایجاد توالی پلی A در انتهای محصول PCR ،آنزیم Taqپلی مراز در مرحله آخر PCR اضافه گردید و که با حذف مرحله هضم آنزیمی (digestion) سبب کلونینگ سریع تر و موثرتر قطعه ژن مورد نظر گردید. لازم به ذکر است که با توجه به نتایج تحقیقات گذشته در این تحقیق نیز باکتری *E.coli* به عنوان میزبان انتخاب شد.

استرپتوکینیاز های اصلاح شده ساختاری به چندین روش تولید شده اند: جهش ژنتیکی، تکنولوژی DNA نوترکیب و اصلاح سازی شیمیایی یا آنزیماتیکی استرپتوکینیاز طبیعی. استرپتوکینیاز موتانت با پایداری بیشتری نیز تهیه شده است (۱۵). تولید انواع استرپتوکینیاز مهندسی شده سبب طولانی شدن نیمه عمر استرپتوکینیاز فعال شده است و از همین نکته برای تولید اشکال استرپتوکینیاز مقاوم به پلاسمین و همچنین انواع فعال تر از استرپتوکینیاز طبیعی، استفاده شده است (۱۷ ، ۱۶). به دلیل اهمیت فراوان تولید پروتئین نوترکیب استرپتوکینیاز پژوهش هایی برای بهینه سازی تولید آن از روش کلونینگ ژن استرپتوکینیاز انجام شده است که به چند مورد آن که در سال های اخیر در کشور انجام شده است پرداخته می شود.

در تحقیقی مولایی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به تولید پروتئین استرپتوکینیاز *استرپتوکوک گروه A* در باکتری *E.coli* به شکل نوترکیب با استفاده از ناقل پلاسمیدی سیستم pET پرداخته شد. در پلاسمید pET32a ترادف ویژه مربوط به ۶ هیستدین در دوسر مکان کلونینگ ژن قرار گرفت. این ترادف برای خالص سازی پروتئین های تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی به کار می رود (۱۸). در مطالعه عربی و همکاران در سال ۲۰۱۱ سیستم ناقل پلاسمیدی pET از جمله قوی ترین سیستم ها برای ژن و تولید پروتئین های نوترکیب در باکتری *E.coli* مطرح شد. در این سیستم، ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 بود و رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور با RNA پلی مراز فاژT7،که در سلول باکتری *E.coli* کلون شده بود، انجام گرفت. در این مطالعه استرپتوکینیازهای کوتاه شده و استرپتوکینیاز کامل در دو وکتور pQE30 و pET41a کلون شدند و نتایج نشان داد استرپتوکینیاز کامل در هر دو وکتور بیان شد در حالی که استرپتوکینیاز کوتاه شده فقط در وکتور pET41a بیان می شود و با بررسی فعالیت این دو نوع پروتئین های نوترکیب، کاهش ۸۳ تا ۹۱ درصدی در فعالیت استرپتوکینیاز کوتاه شده مشاهده شده است

(۱۹). در مطالعه بابا مقدم و همکاران پس از استحراج ژن استرپتوکیناز و تکثیر آن، کلونینگ در حامل pGEX-4T-2 تحت پروموتوتر قوی tac ، انجام شد. سپس درمیزبان *E.coli* سویه BL21(DE3)plysS´ ترانسفورم شد و موفقیت کلونینگ با میزان بیان بالای پروتئین نوترکیب بیش از ۴۵٪ پروتئین های میزبان تایید شد (۲۰). همچنین روش های متفاوتی به منظور افزایش نیمه عمر عوامل ترومبولیتیک و کاهش ایمنی زایی آن ها به کارگرفته شده است که از آن میان می توان به اسیلاسیون کمپلکس پلاسمینوژن- استرپتوکیناز، اتصال پروتئین وصل شونده به مالتوز به انتهای آمینی استرپتوکیناز و اخیرا پگیلاسیون اختصاصی استرپتوکیناز اشاره نمود. در این خصوص می توان به ذکر مطالعه باقری و همکاران در سال ۲۰۱۶ که به منظور بررسی شرایط لازم جهت انجام پگیلاسیون اختصاصی استرپتوکیناز صورت گرفته است، پرداخت (۲۱). در ان تحقیق با انجام موتاسیون در سطح ژن و ایجاد کدون مربوط یه اسیدآمینه سیستئین در ناحیه مناسب ژن بیان کننده، اشکال کامل وکوتاه شده استرپتوکیناز ایجاد شده است. ناحیه در نظر گرفته شده برای ایجاد موتاسیون دور از منطقه فعال آنزیم قرار داشت و به منظور تسهیل در انجام پگیلاسیون، این منطقه در سطح پروتئین و دردسترس انتخاب شده بود. پس از کلونینگ ژن موتانت و غیرموتانت درون وکتور pET26-b و ترانسفورم شدن در میزبان *E.coli*، میزان پروتئین های نوترکیب و فعالیت ان ها سنجیده شد. نتایج آنها نشان داد میزان فعالیت پروتئین موتانت (با سیستئین جایگزین شده) ۱۰٪ افزایش داشته و این پروتئین می تواند مولکول مناسبی برای پگیلاسیون اختصاصی استرپتوکیناز باشد (۲۱). نتایج تمامی مطالعات نشان می دهد باکتری *E.coli* به عنوان میزبانی مناسب برای بیان پروتئین های نوترکیب هم در تحقیق ها و هم در صنعت، به طور گسترده کاربرد دارد. زیرا این میزبان بیانی، با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و موتاسیون در پروتئازهای خود، امکان بیان بیشتر پروتئین نوترکیب را فراهم می آورد. بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده در این تحقیق نیز برای انجام کلونینگ باکتری *E.coli* به عنوان میزبان انتخاب شد و از روش TA-cloning برای افزایش کارایی کلونینگ ژن استرپتوکیناز و تولید این پروتئین نوترکیب استفاده شد.

نتیجه گیری

استرپتوکوکوس ها فاکتورهای بیماری زای متعددی دارند که نشان دهنده ماهیت بیماری زایی پیچیده آن است، هرکدام از این فاکتورهای بیماری زا در عفونت های استرپتوکوکی نقش مهمی دارند، پروتئین های ترشح شده از این باکتری نیز نقش مهمی در انتشار و آسیب بافت دارند. با این وجود امروزه از برخی از این پروتئین ها در جهت درمان بیماری ها استفاده می شود، که از جمله این پروتئین ها استرپتوکیناز است. *استرپتوکوکوس* ها به منظور نفوذ در بین لایه های سلولی موادی ترشح می کنند که سبب تبدیل مولکول های پلاسمینوژن به پلاسمین شده و در نهایت منجر به هضم ماتریکس بین سلولی می شود. با توجه به ویژگی های استرپتوکیناز جهت حل و هضم لخته های خونی و از طرفی بازدهی کم در تولید این آنزیم و بیماری زا بودن آن، توسط *استرپتوکوکوس* ها، موجب شده که تولید این پروتئین به صورت نوترکیب مورد توجه قرار بگیرد. همچنین امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی تهیه و تخلیص پروتئین های نوترکیب از جمله استرپتوکیناز به عنوان یک امر ضروری در پزشکی و درمان بیماران مطرح است. برای تولید این پروتئین، به صورت نوترکیب، پیکره باکتری و بخش های غیرضروری حذف شده و تنها بخشی از باکتری که ژن کد کننده استرپتوکیناز است مورد استفاده قرار می گیرد، در واقع در این روش از یک ژن یا فراورده آن برای تولید دارو استفاده می شود و تلاش می شود که پروتئین را به جای استخراج از باکتری در سیستم های دیگری تولید کرد و با توجه به کاربرد استرپتوکیناز در درمان ترومبوز، مطالعات زیادی در زمینه تهیه این داروی نوترکیب صورت گرفته است. اما با وجود امکان تولید پروتیین های نوترکیب در حامل ها و میزبان های گوناگون هنوز هم تهیه و تخلیص پروتئین های نوترکیب به عنوان یک

مسئله مهم مطرح است. بنابراین در این تحقیق به کلونینگ موثر ژن استرپتوکیناز از باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* در میزبان *E.coli* پرداخته شد که بتواند در آینده جهت بهینه سازی تولید پروتئین نوترکیب استرپتوکیناز برای درمان سکته قلبی و مغزی و بعنوان ترومبولیز (لیز کننده لخته خون) مورد استفاده قرار گیرد و در علم داروسازی و پزشکی و در زمینه درمان و بهبودی حال بیماران و کاهش هزینه های اقتصادی موثر باشد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی و مسئولان محترم آزمایشگاه پاسارگارد به خصوص آقای دکتر امینی که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری و تشکر می گردد.

منابع

1. Nagamalesh UM, Prakash VS, Naidu KCK, Sarthak S, Hegde AV, Abhinay T. Acut pulmonary thromboembolism: Epidemiology, predictors, and long-term outcome - A single center experience. Indiana Heart J. 2017; 69(2): 160-164.

2. Monzavi N, Aghasadeghi MR, Arabi R, Memarnejadian A, Sadat M, Khanahmad H, Ebrahimi M, Roohhvand F. Design, cloning, expression and evaluation of cysteine- substitutes of intact and truncated molecules of streptokinase. Physiology and Pharmacology. 2010; 14 (1): 56 – 65.

3. Banerjee A, Chisti Y, Banerjee U. Streptokinase--a clinically useful thrombolytic agent. Biotechnol Advance. 2004; 22(4): 287–307.

4. Parker W, Storey R. Long-term antiplatelet therapy following myocardial infarction: implications of PEGASUS-TIMI 54. Heart. 2016; 102(10): 783–789.

5. Maheshwari N, Kantipudi S, Maheshwari A, Arora K, Vandana, Kwatra N, Sahni G. Amino-Terminal Fusion of Epidermal Growth Factor 4,5,6 Domains of Human Thrombomodulin on Streptokinase Confers Anti-Reocclusion Characteristics along with Plasmin-Mediated Clot Specificity. PLoS One. 2016; 11(3): e0150315.

6. Vellanki R, Potumarthi R, Doddapaneni K, Anubrolu N, Mangamoori L. Constitutive optimized production of streptokinase in Saccharomyces cerevisiae utilizing glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter of Pichia pastoris. Biomed Res Int. 2013; 20(13): 268-249.

7. Jafari R, Mirshahi M. Production and purification of recombinant streptokinase Using pMAL expression vector. Tehran University Medical Journal. 2007; 65(1): 13-18.

8. Lotfi A, Schweiger MJ, Giugliano G, Murphy S, Cannon CP. High-dose atorvastatin does not negatively influence clinical outcomes among clopidogrel treated acute coronary syndrome patients-a Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) analysis. Am Heart J. 2008; 155(5): 954–958.

9. Brown T. Gene cloning and DNA analysis. John Wiley & Sons Ltd press, UK. 6 th edition. 2010: 328-338.

10. Doogab Y. Genetic Engineering and its Emergence in Biotechnology. University of Chicago Press, USA. 1th

edition. 2015: 103-260.

11. Kunamneni A, Abdelghani T, Ellaiah P. Streptokinase--the drug of choice for thrombolytic therapy. Journal Thromb Thrombolysis. 2007; 23(1): 9–23.

12. Kumar R, Singh J. Expression and secretion of a prokaryotic protein streptokinase without glycosylation and degradation in Schizosaccharomyces pombe. Yeast. 2004; 21(16): 1343–1358.

13. Adivitiya-Dagar V, Devi N, Khasa Y. High level production of active streptokinase in Pichia pastoris fed-batch culture. Int J Biol Macromol. 2016; 83: 50–60.

14. Malke H, Steiner K, Gase K, Frank C. Expression and regulation of the streptokinase gene. Methods. 2000; 21(2): 111–124.

15. Pratap J, Rajamohan G, Dikshit K. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from Pichia pastoris: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53(4): 469–475.

16. Tharp AC, Laha M, Panizzi P, Thompson MW, Fuentes-Prior P, Bock P. Plasminogen substrate recognition by the streptokinase-plasminogen catalytic complex is facilitated by Arg253, Lys256, and Lys257 in the streptokinase beta-domain and kringle 5 of the substrate. J Biol Chem. 2009; 284(29): 19511–1921.

17. Yadav S, Aneja R, Kumar P, Datt M, Sinha S, Sahni G. Identification through combinatorial random and rational mutagenesis of a substrate-interacting exosite in the gamma domain of streptokinase. J Biol Chem. 2011; 286(8): 6458–6469.

18. Molaee N, Abtahi H, Mosayebi Gh. Expression of Recombinant Streptokinase from *Streptococcus Pyogenes and* its Reaction with Infected Human and Murine Sera. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(9): 985-989.

19. Arabi R, Roohvand F, Noruzian, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Khanahmad H, Sadat M, Motevali F. Cloning and expression of truncated and intact streptokinase molecules in E.coli and evaluation of their biological activities. Journal Agriculture Biotechnology. 2011; 2(1): 55-67.

20. Njadmoghadam MR, Modaresi M, Babashamsi M, Chamankhah M. Streptokinase: extraction, cloning and high expression of active recombinant protine with facility in purification. Journal of shahid beheshti medical science University. 2006; 30(3): 245-252.

21. Bagheri S, Maghsoudi H, Motevalli F, KhoshdelNezamiha F, Hasanzadeh SM, Arabi-Mianroodi R. Site-Directed Mutation,Cloning and Expression of Streptokinase for reducing a New Suitable Molecule for PEGylation. Arak Medical University Journal. 2016; 19(108): 1-10.