بررسی تولید و تخلیص استرپتوکیناز نوترکیب با استفاده از وکتور بیانی pMAL

رحیم جعفری
منوچهر میرشاهی*

گروه بیوشیمی
دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکیناز (SK) یک داروی ویژه و موثر در درمان ترومبولیتیک سکته‌های حاد قلبی می‌باشد. علی‌رغم وجود محدودیت‌های قابل توجه، به‌دلیل قیمت نسبتا" پایین استرپتوکیناز این پروتئین هنوز یک داروی انتخابی به‌ویژه در کشورهای کم‌درآمد می‌باشد. در بررسی حاضر، تولید و تخلیص استرپتوکیناز با استفاده از وکتور بیانی pMAL مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی: ابتدا پلاسمید pMAL که حاوی ژن *skc* (بدست‌آمده از *Streptococcus equisimilis* H46A) بود، به میزبان مناسب (E.coli BL21) انتقال یافت. در مرحله بعد شرایط تولید استرپتوکیناز از نظر دما، غلظت‌های مختلف IPTG به‌عنوان القاءگر و نیز مدت زمان القاء بهینه‌سازی شد. این پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE-Sepharose خالص‌سازی شده و در نهایت خلوص و فعالیت آن تعیین گردید.

یافته‌ها: پس از بهینه‌سازی شرایط تولید، قسمت عمده پروتئین تام باکتری متعلق به SK-MBP (اسرپتوکیناز-پروتئین متصل‌شونده به مالتوز) گردید. SK-MBP خالص‌شده بر روی ژل SDS-PAGE یک باند تک را نشان داد. فعالیت بیولوژیکی SK-MBP خالص‌شده در حضور پلاسمینوژن با استفاده از سوبسترای سنتتیک (S2251) اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده فعالیت بالای آن بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه از وکتور بیانی pMAL که پروتئین فیوژن محلول (SK-MBP) را در E.coli BL21 تولید می‌کند استفاده کرده‌ایم. با استفاده از این روش، علی‌رغم بیان بالای SK-MBP، از تشکیل Inclusion body جلوگیری شد. انتخاب میزبان مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب یکی از مهمترین فاکتورهایی است که بر روی سطح بیان پروتئین مورد نظر تاثیر می‌گذارد. پیشنهاد می‌شود از میزبان‌های دیگر نیز برای این منظور استفاده شود.

کلمات کلیدی: استرپتوکیناز، ترومبولیتیک، pMAL.

*نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۴۴۰۸ و ۳۴۲۵
email: mirshahi_mc@yahoo.com

مقدمه

تشکیل لخته در سیستم گردش‌خون (Thrombosis) باعث مسدود شدن رگها گردیده و می‌تواند عواقب خطرناکی مانند سکته و مرگ را در پی داشته باشد. یک سیستم هموستاتیک سالم تشکیل هرگونه لخته را در جریان خون نرمال مهار می‌کند اما زمانی‌که این سیستم قادر به حل کردن لخته‌های تشکیل شده نباشد عوارضی مانند سکته‌های مغزی و قلبی را به‌دنبال خواهد داشت. در چنین شرایطی تجویز درون رگی عوامل حل‌کننده لخته (Thrombolytic agents) می‌تواند بیمار را از مرگ و یا عوارض ناشی از سکته نجات دهد.[۱-۳]

برخی از این داروها فعال‌کننده سیستم فیبرینولیز می‌باشند. این داروها به‌طور کلی باعث تبدیل پلاسمینوژن (که اصلی‌ترین جزء سیستم فیبرینولیز می‌باشد) به پلاسمین (که نوعی سرین‌پروتئاز است) شده و در نهایت پلاسمین حاصله با تجزیه رشته‌های فیبرین موجود

در لخته‌های خونی سبب حل شدن آن می‌گردد. استرپتوکیناز یکی از این داروها است و از داروهای دیگر می‌توان یوروکیناز (u-PA) و فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن (t-PA) را نام برد. u-PA و t-PA هر دو فعال‌کننده‌های فیزیولوژیک پلاسمینوژن بوده که به‌طور طبیعی در بدن یافت می‌شوند. اما استرپتوکیناز با اسامی تجاری Streptase و Kabinase[۴] یک پروتئین خارج‌سلولی بوده که توسط گونه‌های مختلفی از استرپتوکوک‌های Beta hemolytic متعلق به گروه‌های A، C و G تولید می‌شود.[۵] استرپتوکیناز یک پروتئین تک‌زنجیره‌ای، متشکل از ۴۱۴ اسید آمینه با وزن ملکولی ۴۷kDa بوده[۶] و از سه‌بخش (Domain) α، β و γ تشکیل شده است.[۷] استرپتوکیناز، در حقیقت آنزیم نبوده بلکه می‌تواند با ملکول‌های پلاسمینوژن کمپلکس یک به یک تشکیل دهد که این کمپلکس به نوبه خود سایر ملکول‌های پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل می‌کند. ملکول‌های پلاسمین نیز با تجزیه رشته‌های فیبرین سبب حل شدن لخته‌های خون می‌شوند.[۸]

از بین داروهای حل‌کننده لخته‌های خون t-PA و استرپتوکیناز بیشترین استفاده را داشته‌اند و هر یک مزایا و معایب خاص خود را بهمراه دارند. تحقیقات زیادی به‌منظور مقایسه کارایی کلینیکی استرپتوکیناز نوترکیب و t-PA صورت گرفته است اما این بررسی‌ها به‌طور کلی، برتری خاصی را در استفاده از این دو دارو در مقایسه با یکدیگر نشان نداده است. امروزه استرپتوکیناز عموماً به‌طور نوترکیب تولید می‌شود و در مقایسه با t-PA قیمت پایین‌تری دارد. در حال حاضر استرپتوکیناز به‌عنوان داروی انتخابی به‌ویژه در کشورهای کم‌درآمد محسوب می‌شود.[۵] با توجه به نیاز داخلی کشور به داروی استرپتوکیناز و همینطور قیمت نسبتاً″ بالای آن، نیاز به تولید این دارو در کشورمان احساس می‌شود. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی کارایی وکتور pMAL-cX2 در بیان و تولید استرپتوکیناز نوترکیب می‌باشد. بیان ژن استرپتوکیناز در وکتور مذکور باعث تولید فیوژن پروتئین SK-MBP (استرپتوکیناز متصل به Maltose binding protein) با وزن ملکولی حدود ۹۰KD می‌شود.

روش بررسی

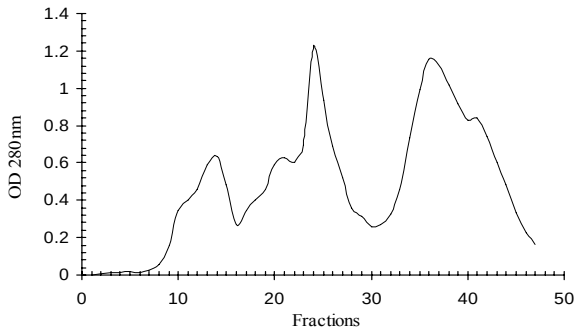
از پلاسمید pMAL-c2X به همراه ژن skc (ژن استرپتوکیناز مربوط به گونه *Streptococcus equisimilis* H46A که یک استرپتوکوک متعلق به گروه C می‌باشد)، اهدایی از طرف خانم دکتر بهناز پرهامی از دانشگاه Vermont آمریکا، استرپتوکیناز استاندارد Kabikinase محصول شرکت Kabi، سوبسترای S-2251 (محصول شرکت Chromogenix) و سایر مواد از شرکت Merck و Sigma تهیه گردید. به‌منظور انتقال پلاسمید به میزبان مناسب، ابتدا از باکتری E.coli سویه BL21 سلول‌های مستعد (competent cell) تهیه شد (با استفاده از شستشوی باکتری‌های درحال رشد با آب مقطر و گلیسرول ۲۰ درصد استریل‌شده در دمای $4^{\circ}C$). سپس پلاسمید با استفاده از روش الکتروپوریشن، به باکتری‌ها منتقل گردید. برای غربالگری از محیط کشت LB جامد حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml استفاده گردید. (یک لیتر محیط کشت LB: ده گرم Tripton، ده گرم NaCl، پنج گرم عصاره مخمر به‌علاوه ml ۱۰۰۰ آب مقطر). برای تولید استرپتوکیناز از محیط کشت LB مایع در دمای $37^{\circ}C$ استفاده شد. در این مرحله با تغییر دادن غلظت IPTG (به‌عنوان القاءگر) و نیز مدت زمان القاء، شرایط تولید استرپتوکیناز (SK-MBP) بهینه شد. در این بررسی از غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار IPTG استفاده شد و زمان‌های القاء برای هر کدام از غلظت‌ها، ۰، ۱، ۲، ۳/۵ و ۵ ساعت در نظر گرفته شد. پس از برداشت نمونه‌ها و رسوب دادن آنها در سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm، $4^{\circ}C$) به مدت پنج دقیقه) مایع رویی دور ریخته شده و به هر نمونه، لیز بافر (Tris-HCl ۵۰ mM، pH=۴/۷ و 2 mM EDTA) اضافه گردید متعاقبا″ سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه سونیکاتور متلاشی شدند. نمونه‌ها به‌مدت ده دقیقه به روش فوق سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت استرپتوکیناز جمع‌آوری گردید. به منظور مقایسه فعالیت نمونه‌ها با یکدیگر از یک روش کیفی که اساس آن حل کردن نسبی پلاسمای منعقد شده می‌باشد استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از سرم فیزیولوژی از عصاره‌های فوق رقت‌های متوالی ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰ و ۱/۸۰ تهیه شد. به µl ۲۰ از هر نمونه مورد آزمایش به اندازه µl ۱۲۰ پلاسمای سیتراته (نسبت ۹:۱ پلاسما به تری سدیم سیترات ۳/۲ درصد) و µl ۱۰ محلول M ۰/۲ از CaCl2 اضافه شده و جهت منعقد شدن پلاسما به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شدند. بعد از این مدت میزان حل شدن پلاسمای منعقد شده (لخته) به‌صورت چشمی مقایسه گردیدند. به این ترتیب که برای حل شدن کامل لخته، به‌طور قراردادی عدد پنج، برای حل نشدن آن عدد صفر و برای حل شدن نسبی، اعداد بین صفر تا پنج در نظر گرفته شد.

خالص‌سازی SK-MBP: در این مرحله پس از کشت باکتری به میزان زیاد، همانند روش قبل عصاره باکتری استخراج شد با این تفاوت که در این مرحله به لیز بافر PMSF ۱ mM اضافه گردید. به‌منظور خالص‌سازی، عصاره باکتری از ستون DEAE سفارز عبور داده شد و پس از جذب پروتئین‌ها به ستون و شستشوی زیاد جهت حذف PMSF، از شیب نمکی صفر تا ۰/۵ مولار NaCl جهت جدا کردن (Elution) پروتئین‌های جذب شده به ستون استفاده گردید. غلظت پروتئین موجود در نمونه‌های خارج‌شده از ستون با استفاده از روش Bradford و جذب در طول موج ۲۸۰ nm تعیین گردید و میزان خلوص پروتئین نیز با استفاده از SDS-PAGE (آکریل آمید ۱۰ درصد) در شرایط غیر احیایی همراه با رنگ‌آمیزی آبی کوماسی مشخص شد. فعالیت بیولوژیک SK-MBP قبل و بعد از خالص‌سازی اندازه‌گیری شد. برای این منظور در پلیت الایزا رقت‌های متوالی از عصاره باکتری، SK-MBP خالص‌شده و همچنین استرپتوکیناز استاندارد (Kabikinase) تهیه گردید. در هر چاهک به اندازه ۲۵ µl PBS، pH=۷/۴، ۲۵ µl نمونه‌های رقیق‌شده و ۲۵ µl پلاسمینوژن با غلظت ۴۰ µg/ml اضافه شده و به‌مدت پنج دقیقه در دمای ^{oC} ۳۷ به‌منظور تشکیل کمپلکس استرپتوکیناز-پلاسمینوژن، انکوبه شد. سپس به هر چاهک ۲۵ µl سوبسترای S-2251 با غلظت ۱ mg/ml اضافه کرده و رنگ ایجاد شده در طی زمان در طول موج ۴۰۵ nm به‌وسیله دستگاه ELISA reader خوانده شد.

یافته‌ها

نمونه‌های برداشت‌شده پس‌از استخراج عصاره در رقت‌های مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. در رقت ۱/۴۰ به‌طور متوسط بیشترین حل لخته مربوط به غلظت‌های ۱ mM، ۱/۵ mM و ۲ mM IPTG می‌باشد. در این رقت تفاوت چندانی بین این سه غلظت IPTG در حل کردن لخته وجود نداشت. از نظر زمانی بیشترین فعالیت در زمان ۳/۵ ساعت بدست آمد (جدول شماره۱). به‌منظور خالص‌سازی، عصاره باکتری از ستون DEAE سفارز عبور داده شد و پس از جذب پروتئین‌ها به ستون و شستشوی زیاد جهت حذف PMSF، از شیب نمکی صفر تا ۰/۵ مولار NaCl جهت جدا کردن (Elution) پروتئین‌های جذب‌شده به ستون استفاده گردید. نمونه‌های خروجی با حجم ۱ ml جمع‌آوری گردیده و برای اندازه‌گری مقدار پروتئین هر یک، جذب آن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شده و نهایتا" کروماتوگرام آن رسم گردید. همانطور که در کروماتوگرام نشان داده شده است نمونه مربوط به SK-MBP در فرکشن‌های ۲۰ تا ۳۰ از ستون خارج می‌گردند (شکل شماره۱). جهت تایید خلوص نمونه‌های SK-MBP تخلیص‌شده با SDS-PAGE، استرپتوکیناز خالص‌شده با ستون کروماتوگرافی DEAE سفارز توسط ژل SDS-PAGE ۱۰٪ در شرایط غیراحیایی الکتروفورز گردید و با روش آبی کوماسی رنگ‌آمیزی شد. همانطور که در شکل شماره۲ مشاهده می‌گردد نمونه مربوط به فرکشن ۲۵ دقیقا" معادل پروتئین بیان‌شده در باکتری یعنی SK-MBP می‌باشد.

همانطور که در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد، فعالیت SK-MBP روی سوبسترای سنتتیک S-2251 و سوبسترای طبیعی (فیبرین موجود در پلاسمای منعقدشده) مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور فعالیت SK-MBP قبل و بعد از خالص‌سازی اندازه‌گیری شد. همانطورکه جدول شماره۱ نشان می‌دهد رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۴۰ عصاره باکتری بعد از ۲۰ دقیقه باعث حل کامل لخته‌های پلاسما می‌گردند که این امر بیانگر تولید استرپتوکیناز فعال توسط باکتری می‌باشد. به‌منظور اندازه‌گیری مقدار واحد استرپتوکیناز موجود در نمونه‌های مورد بررسی، فعالیت SK-MBP با استفاده از سوبسترای سنتتیک S-2251 قبل و بعد از خالص‌سازی نمونه‌ها مطابق روش ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها اندازه‌گیری شد. با مقایسه شیب منحنی‌های بدست آمده از فعالیت SK-MBP، با منحنی استاندارد مربوط به استرپتوکیناز استاندارد (Kabikinase)، در نهایت مقدار واحد آنزیم فعال موجود در نمونه‌ها بدست آمد. نتایج در جدول شماره۲ درج گردیده است.



شکل-۱: کروماتوگرام تخلیص SK-MBP با استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE سفارز

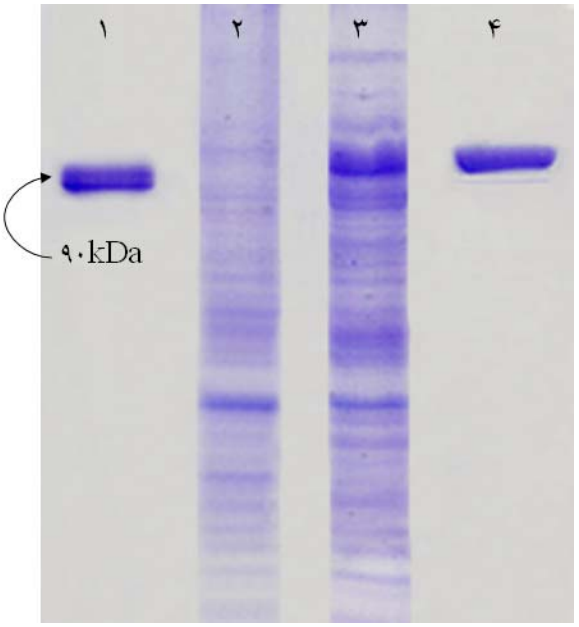
جدول-۱: اندازه‌گیری فعالیت فیبرینولیتیکی عصاره رقیق‌شده باکتری‌ها و تعیین شرایط بهینه کشت با توجه به غلظت IPTG و زمان القاء

		IPTG 0mM				IPTG 0.5mM				IPTG 1mM				IPTG 1.5mM				IPTG 2mM			
		1 h	2 h	3.5 h	5 h	1 h	2 h	3.5 h	5 h	1 h	2 h	3.5 h	5 h	1 h	2 h	3.5 h	5 h	1 h	2 h	3.5 h	5 h
Serial dilution	1/10	۳	۳	۴	۴	۴	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
	1/20	۲	۲	۲	۳	۳	۴	۴	۵	۴	۴	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
	1/40	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۴	۴	۳	۲	۳	۴	۳	۳	۳	۴	۳
	1/80	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۱	۲	۱

جدول-۲: پروتئین تام، واحد SK-MBP و فعالیت‌ویژه آن قبل‌وبعد از خالص‌سازی

	Total Protein	Total Enzyme Unit	Specific Activity
Crude	۵۵۰ mg	۲۰۰۰۰ IU	۳۶ IU/mg
Purified	۱۵۰ mg	۱۴۶۰۰ IU	۹۷ IU/mg

نتایج فوق به ازای یک‌لیتر کشت باکتری (حدود ۳/۵ گرم باکتری تر) محاسبه شده‌اند.



شکل-۲: الگوی الکتروفورزی نمونه‌های پروتئینی در طول خالص‌سازی ۱: مارکر وزن ملکولی ۲: باکتری BL21 بدون پلاسمید ۳: عصاره خام باکتری قبل از خالص‌سازی ۴: SK-MBP خالص شده

بحث

امروزه پلاسمیدهایی به بازار آمده‌اند که با وجود پروموترهای قوی در ساختار آنها امکان دست‌یابی به بیان بالای پروتئین ممکن‌شده است به‌گونه‌ای که گاهی تا ۷۰-۶۰٪ پروتئین تام باکتری، مربوط به پروتئین بیان‌شده توسط وکتور مورد نظر می‌باشد. این بیان زیاد به‌ویژه در مواردی‌که پروتئین نوترکیب در درون سیتوپلاسم تجمع یافته و به پری‌پلاسم و یا خارج سلول منتقل نمی‌گردد می‌تواند منجر به تشکیل توده‌های پروتئینی نامحلول و unfold به‌نام Inclusion Body (IB) گردد. پلاسمید مورد استفاده در این مطالعه pMAL-c2X محصول شرکت New England Biolab می‌باشد. این پلاسمید دارای ناحیه کدکننده پروتئین متصل‌شونده به مالتوز (Maltose Binding Protein) بوده که در نهایت پس از ترجمه به‌صورت متصل‌شده به پروتئین موردنظر در سلول باکتری آزاد می‌شود. MBP پروتئینی kDa ۴۲ بوده که به‌شدت محلول می‌باشد؛ بنابراین درصورتی‌که MBP به پروتئین دیگری متصل شده باشد سبب افزایش حلالیت آن و در نتیجه مانع از تشکیل IB می‌شود. از طرف دیگر به دلیل تمایل MBP به مالتوز می‌توان پروتئین مورد نظر را با استفاده از ستون رزین آمیلوز با روش کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی نمود. نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان پروتئین SK-MBP به میزان زیاد می‌باشد اما به‌دلیل حلالیت بالای MBP به هیچ وجه IB تشکیل نشد. یکی از مهمترین فاکتورهای دخیل در تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده از میزبان مناسب می‌باشد. باکتری‌هایی که از طرف شرکت New England Biolab برای وکتور pMAL-c2X، پیشنهاد شده‌اند عبارتند از: TB1، ER2507، ER2508، CAG626، CAG597، CAG629، PR1031،

KS1000 و UT5600. از بین باکتری‌های پیشنهادی دو باکتری آخر فاقد برخی از پروتئازها هستند اما به‌دلیل اینکه باکتری‌های فوق در هیچ‌یک از کلکسیون‌های سلولی کشور موجود نبودند بالاجبار از باکتری BL21 به‌عنوان میزبان استفاده شد. با توجه به شکل شماره۲ ملاحظه می‌شود که باکتری BL21 که حاوی پلاسمید است دارای دو باند قوی در محدوده ۹۰ کیلو دالتون بوده که در باکتری کنترل (بدون پلاسمید) دیده نمی‌شود. علت تشکیل دو باند به‌جای یک باند احتمالاً به‌دلیل اثر یک یا چند نوع پروتئاز بر روی پروتئین SK-MBP می‌باشد که با جدا کردن بخش کوچکی از آن سبب به‌وجود آمدن باند زیرین می‌شود. سونیکاسیون علاوه‌بر تخریب دیواره سلول باکتری می‌تواند بر روی پروتئین‌ها نیز اثر گذاشته و سبب شکسته شدن آنها شود اما در مورد پروتئین مذکور احتمالاً سونیکاسیون نقشی در تجزیه آن ندارد زیرا باند زیرین حتی قبل از سونیکه کردن باکتری قابل مشاهده است. این احتمال وجود دارد که با عوض کردن باکتری BL21 (به‌عنوان میزبان) با باکتری‌هایی که دارای نقص در تولید برخی از پروتئازها می‌باشند (KS1000 یا UT5600) بتوان از تخریب پروتئین استرپتوکیناز جلوگیری کرد. اما توجه به این نکته مهم است که بخش عمده استرپتوکیناز سالم و دست‌نخورده، پس از خالص‌سازی فعالیت خود را تا اندازه زیادی حفظ کرده است (جدول شماره۲). همانطور که می‌دانیم یکی از مهمترین جنبه‌های تولید یک پروتئین، مرحله خالص‌سازی آن می‌باشد. هر مرحله خالص‌سازی هزینه‌های خود را داشته و از طرف دیگر در هر مرحله بخشی از پروتئین به‌هدر رفته و یا غیرفعال می‌شود بنابراین هرچه مراحل خالص‌سازی کمتر باشد به‌همان اندازه روش تخلیص مناسب‌تر خواهد بود. از بین روش‌های خالص‌سازی، استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی یکی از مناسبترین روشها برای چنین منظوری می‌باشد که در آن پروتئین مورد نظر به‌صورت یک مرحله‌ای و با بازده بالا بدست می‌آید. همانگونه که گفته شد فیوژن پروتئین SK-MBP را می‌توان با ستون رزین آمیلوز در یک مرحله جداسازی نمود اما به‌دلیل گران بودن این ستون و همینطور در دسترس نبودن آن، سعی شد این عمل با استفاده از روش‌های معمول کروماتوگرافی انجام شود. برای این منظور پروتئین SK-MBP به‌وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ستون DEAE-Sepharose در یک مرحله تا اندازه بسیار زیادی خالص شد (شکل شماره۲) و اندازه‌گیری فعالیت پروتئین استرپتوکیناز قبل و بعد از خالص‌سازی نشان‌دهنده کارآیی بالای این روش تخلیص بود. در نهایت به‌عنوان ادامه کار پیشنهاد می‌شود که از باکتری‌های دیگری (به‌جز BL21) به‌منظور بررسی تاثیر آنها در میزان بیان پروتئین استفاده شود. همچنین می‌توان وکتورهای بیانی دیگر را (مثل سیستم PET) به‌منظور افزایش تولید این پروتئین مورد ارزیابی قرار داد.

References

1. Collen D, Stump DC, Gold HK. Thrombolytic therapy. *Annu Rev Med* 1988; 39: 405-23.
2. Collen D. Coronary thrombolysis: streptokinase or recombinant tissue-type plasminogen activator? *Ann InternMed* 1990; 112: 529-38.
3. Francis CW, Marder VJ. Fibrinolytic therapy for venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1991; 34: 193-204.
4. Ellis K, Brener S. New fibrinolytic agents for MI: as effective as current agents, but easier to administer. *Cleve Clin J Med* 2004; 71: 23-5.
5. Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase--a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol Adv* 2004; *22*: 287-307.
6. Malke H, Ferretti JJ. Streptokinase: cloning, expression, and excretion by Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3557-61.
7. Reed GL, Houng AK, Liu L, Parhami-Seren B, Matsueda LH, Wang S, *et al*. A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator. *Biochemistry* 1999; 96, 8879-83.
8. Caballero AR, Lottenberg R, Johnston KH. Cloning, expression, sequence analysis, and characterization of streptokinases secreted by porcine and equine isolates of Streptococcus equisimilis. *Infect Immun* 1999; 67: 6478-86.

Production and purification of recombinant streptokinase using pMAL expression vector

Jafari R
Mirshahi M*

Department of Biochemistry
Tarbiat Modares University

Abstract

***Background*:** Streptokinase (SK) is an effective and specific thrombolytic treatment of acute myocardial infarction. Despite its significant limitations, streptokinase remains the drug of choice particularly in countries with poorer economies because of its relatively low cost. In this study, the production and purification of streptokinase using a pMAL expression vector were evaluated.

***Methods*:** The pMAL vector, including the *skc* gene, obtained from *Streptococcus equisimilis* H46A, was transformed into *E. coli* BL21 to produce the soluble active fusion protein SK-MBP. The conditions of SK production were optimized by manipulating temperature, induction time and IPTG concentrations. This protein was purified by DEAE-sepharose column chromatography and the final purity was determined and activity of purified SK-MBP was measured using a synthetic substrate (S2251).

***Results*:** After optimizing the production conditions, SK-MBP was the major portion of total protein. Purified SK-MBP formed a single band using SDS-PAGE and had high biological activity.

***Conclusion*:** In this study we used pMAL expression vector to produce SK-MBP in *E. coli* BL21. Using this method we prevented the accumulation of inclusion bodies in spite of the high level of production of SK-MBP. Choosing a suitable host organism for the production of recombinant proteins is one of the most important factors that influence the level of desired protein production. Further studies are recommended to test other host organisms for this purpose.

Keywords: Streptokinase, Thrombolytic, pMAL

* Corresponding author: Depart. of Biochemistry, Tarbiyat Modares University
Tel: +98-21-88011001(4408-3425)
email: mirshahi_mc@yahoo.com