التحري عن بكتريا المسبحيات المنتجة لإنزيم streptokinase من مرضى الجهاز التنفسي في مستشفيات مدينة الحلة

إسراء غانم هادي ، إيمان محمد جار الله

جامعة بابل – كلية العلوم

الخلاصة :

تم عزل 61 عزلة بكتريا *Streptococcus sp.* من مسحات بلعوم مرضى الجهاز التنفسي في مستشفيات مدينة الحله للفترة من تشرين الثاني 2010 – آذار 2011 . نقيت العزلات البكتيرية بطريقة الزرع الثانوي على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم لعدة مرات . وبعد الحصول على المستعمرات النقية ، شخصت العزلات البكتيرية اعتمادا على الصفات الزرعية والفحوصات البايوكيميائيه . وقد بينت النتائج أن هذه العزلات كانت تابعة لخمسة أنواع من المسبحيات وهي *S.pyogenes* و *S.mitis* و *S.equisimilis* و *S.salivarius* و *S.suis* . وقد اختير النوع *S.pyogenes* المحلل للدم نوع بيتا لغرض دراسة إنتاجيتها لإنزيم الستربتوكاينيز المستخدم سريريا في علاج الخثرة الدموية . وقد درست الفعالية الإنزيمية للإنزيم الخام وقورنت مع فعاليته بعد ترسيبه بأملاح كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 80% مع الديلزه . وقد ازدادت الفعالية بعد التنقية حيث بلغت 490.625 U/ ml مقارنتا مع الفعالية قبل التنقية حيث بلغت 176.625 U/ ml .

Abstract

Sixty one *Streptococcus sp.* Bacterial species were isolated from throat swabs of respiratory tract patients in Hilla hospitals during the period from November 2010 to March 2011 . These isolates were purified by subculture method on brain heart infusion agar medium for many times . The isolated colonies were identified according to cultural properties and biochemical tests . The results showed that the isolates were belonged to five species of Streptococcus which were *S. pyogenes , S. suis , S. salivarius , S. equisimitis* and *S. mitis* . Beta hemolytic species *S. pyogenes* war tested for streptokinase production (fibrinolytic clinically used enzyme) . Enzymatic activity of crude enzyme was studied and compared with their activity after precipitation by ammonium sulfate precipitation at 80% saturation percentage with dialysis . The activity was increased after purification to reach 490.625 U/ml compared with 176.625 U/ml before it .

المــقدمة Introduction :

نظرا للتغيرات الكبيرة الحاصلة في أنماط الحياة الاجتماعية والاقتصادية في العالم بشكل عام والعراق بشكل خاص فقد ازدادت معدلات الاصابة بالكثير من الامراض القلبية التاجية الناجمة عن تخثر الدم في الشرايين القلبية والتي قد تؤدي الى الموت . لذلك اصبح من الضروري إنتاج عقاقير تعمل على خفض نسب تخثر الدم في الاوعية الدموية (Salarifar , 2008) . هنالك العديد من الكائنات التي تقوم بإنتاج أنزيم الستربتوكاينيز Streptokinase والمتمثلة بالأفاعي Snake وديدان الأرض Earthworm والفطريات Fungi مثل *Fusarium oxysporum* و *Mucor sp.* وكذلك تقوم بإنتاجه الاكتينومايسيتات *Acitnomycetes* والعديد من الأنواع البكتيرية منها *Aeromonas hydrophilia* و *Serratia E15* و *B.natto* و *B.amyloliquefacens* وبكتريا المسبحيات المحللة للدم نوع β B- hemolytic Streptococci (Jian sha etal .,2003)، وسنقتصر في هذا البحث على أنتاج إنزيم الستربتوكاينيز Streptokinase من قبل المسبحيات المقيحة *Streptococcus pyogenes* حيث كان أول تشخيص لبكتريا المسبحيات المنتجة لهذا الإنزيم عام 1874م من قبل Billroth في الجروح المصابة ، فيما بعد أظهرت الدراسات بأن دماء الأشخاص المصابين بالحمى القرمزية Scarlet fever تحتوي على نفس البكتريا وفي عام 1919 م تم تصنيف بكتريا المسبحياتStreptococci إلى مجاميع متباينة هي (ألفا ، بيتا ، كاما) بالاعتماد على نوع

التحلل ، وفي عام 1933م قسم سيرولوجيا Lancefield البكتريا المحللة للدم نوع بيتا من A إلى O ووجد أن المجاميع A , C , G هي أكثر المجاميع إنتاجا للإنزيم وان المجموعة C هي أفضل المجاميع في أنتاج الإنزيم . أن إنزيم الستربتوكاينيز هو بروتين إفرازي ذو وزن جزيئي 46 كيلو دالتون ينتج من سلالات محددة من بكتريا المسبحيات المحللة للدم نوع بيتا A , C , G ويعمل هذا الإنزيم على تنشيط مولد البلازمين plasminogen وتحويله إلى بلازمين فعال من خلال ربطه ببروتين مشابه للبروتين M (Ben Nasr et al.,1994) ويعد عامل انتشار spreading factor يسهم في انتشار البكتريا وتسهيل غزوها للانسجه من خلال قدرته على تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين فعال (Kauuslla et al.,1992) ويعمل الإنزيم على حل الخثره الدموية من خلال موقع ارتباط خاص ولذلك يستخدم كعقار حال للخثره الدموية(Mohammad et al.,2009)تتكون جزيئه هذا الإنزيم من ثلاث مقاطعات Domins تتألف الأولى من 147 حامض أميني وتكون مشابهه لإنزيم ستافلوكاينيز Staphylokinase المفرز من العنقوديات Staphylococci إلا أن قدرته على الارتباط بالبلازمين تكون عشرة أضعاف قدرة ستافلوكاينيز (Arai et al.,1998) وتعمل هذه المقاطعة كمنظم (Regulator) لفعالية بقية الجزيئة ، أما المقاطعتين الثانية والثالثة فتكون ضرورية لتنشيط مولد البلازمين وتحويله إلى بلازمين فعا ل (Parrado et al.,1996 , Rodrignez et al.,1995) ، تحتوي المقاطعة الأولى للإنزيم المنتج من قبل المجاميع A ,C للمسبحيات عروه مكونة من 25 حامض أميني في حين تكون مفقودة في الإنزيم المنتج من العنقوديات والمجموعة G من المسبحيات وتكون ضرورية في عملية التعرف (Recognition) الإنزيمي على مولد البلازمين إذ أن إزالة 12 حامض أميني منها تؤدي إلى انخفاض كبير في كمية البلازمين المنشطة بفعل الإنزيم (Wake hann et al.,2002) أما في مجال الطب ألسريري فقد أستخدم إنزيم الستربتوكاينيز في علاج مرض الخثار الإكليلي Coronary thrombosis (Ko et al.,1995) (Banerjee et al.,2004) كما أستخدم في علاج الفشل القلبي الحاد Acute myocardial infraction (Sherry and Marder,1991)أما الاستخدام الأكثر شيوعا لهذا الإنزيم فهو علاج الخثره ألدمويه(Chitte and Dey,2000) .

الهدف من البحث :

يهدف البحث إلى عزل وتشخيص أنواع بكتيرية تعود إلى الجنس *Streptococcus* منتجة لإنزيم الستربتوكاينيز من عينات مرضى مصابين بأمراض الجهاز التنفسي من مستشفيات مدينة ألحله ودراسة الفعالية الإنزيمية لهذا الإنزيم قبل وبعد عملية التنقية الجزئية .

المواد وطرق العمل Materials and Method :

عزل البكتريا Bacterial isolation :

أخذت 61 مسحة بلعوم من المرضى المصابين بأمراض الجهاز التنفسي العلوي (التهاب الحنجرة واللوزتين) من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة من شهر كانون الأول 2010 ولغاية شهر آذار 2011 .

زرعت المسحات مباشرة في وسط مرق تريتون الصويا مع الازايد والبنفسج البلوري وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 – 48 ساعة . بعد ذلك أخذ ملئ الناقل من النمو وخطط على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم للحصول على مستعمرات مفردة وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 24ساعة ثم فحصت الأطباق للتحري عن المستعمرات النموذجية للمسبحيات ولوحظ كل من نوع التحلل وصفات المستعمرة .

تشخيص العزلات البكتيرية Bacterial isolates idemtification :

شخصت المسبحيات بالاعتماد على صفاتها الزرعية و المجهرية والفحوصات الكيموحيوية بالاعتماد على الطرائق التي ذكرها Macfaddin (2000) .

التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الستربتوكاينيز :

اخذ ملئ عروة الناقل من مزروع بعمر 18ساعة نامي على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم واستعمل لتلقيح 10 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة بعدها أخذ 0.1 مل من الأخير واستعمل لتلقيح 10 مل من الوسط نفسه وحضن بالظروف نفسها ، ثم نقل 0.5 مل من المزروع المنشط وأضيف إلى أنبوبة اختبار معقمة حاوية على 0.2 مل من البلازما البشري 0.8 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي و 0.25 مل من محلول كلوريد الكالسيوم وحضن عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وقورن مع أنبوبة السيطرة الحاوية على 0.5 مل من الوسط المعقم والمعاملة تحت نفس الظروف . النتيجة الموجبة تكون بعدم تكون خثره في أنبوبة الاختبار أو بتكون خثره خفيفة بالمقارنة مع أنبوبة السيطرة (Sanderson et al ., 2006) .

أنتاج الإنزيم الخام Enzyme production :

تم تنمية بكتريا الـ *Streptococcus pyogenes* بواسطة تريتون الصويا أو الوسط قيد الدراسة وحضنت بالحاضنة الهزازة لمدة 3 أيام . ثم بعد ذلك أخذ (5) مل من المزرعة البكتيرية السائلة ونبذ بجهاز المنبذ المبرد بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق بدرجة 4م ومن ثم أهمل الراسب وأخذ الراشح بعدها تم تعقيم الراشح بالمرشحات الدقيقة 0.45 Millipore filter (Kunamneni et al ., 2007) .

قياس الفعالية الإنزيمية Enzyme activity assay :

تم قياس الفعالية الإنزيمية بطريقة Fibrin plate method والمتضمنة مزج محلول الكازائين (2.5 مل من (w/v) 2% في محلول فوسفات الصوديوم Sodium Phosphate buffer , pH 7.4) مع 2 مل من المصل البشري Human serum بعد التعقيم وإضافتها إلى الأكاروز . بعد ذلك صب المزيج في أطباق وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم عمل ثلاثة حفر في كل طبق بسمك 0.5 سم وأضيف له 50 – 100 مايكرو لتر من المحلول الإنزيمي في كل حفرة وحضن في درجة 37 م . بعد ذلك تم قياس إبعاد منطقة التحلل ومنه حدد عدد الوحدات الإنزيمية . حيث أن الوحدة الواحدة من الفعالية الإنزيمية تعرف على إنها كمية الإنزيم في 25 مايكرو لتر من المحلول الإنزيمي والتي تنتج منطقة تحلل مساحتها 1 ملم^2 عند درجة حموضة pH 7.7 في 35 م لمدة 18 ساعة (Lizano and Johanston , 2005) .

تنقية إنزيم الستربتوكاينيز Streptokinase purification :

الترسيب بكبريتات الامونيوم Ammonium sulfate precipitation :

أ . الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 80% : تم إضافة 52.3 غرام من كبريتات الامونيوم تدريجيا إلى 100 مل من محلول الإنزيم الخام مع التحريك المستمر باستخدام المحرك المغناطيسي (Magneticstirrer) وفي درجة حرارة 4 م لمدة 60 دقيقة نبذ المحلول بسرعة 7000 دورة / دقيقة في درجة 4م لمدة ساعة واحدة ، ثم أذيب الراسب بـ 10 مل من دارئ الفوسفات ذو الأس الهيدروجيني 7 ، بعدها قدرت الفعالية الإنزيمية في الراسب والراشح .

ب . التجزئة بملح كبريتات الامونيوم : أضيف 5.7 و 5.9 و 6.1 و 6.3 و 6.6 و 6.8 و 16.6 غم من كبريتات الامونيوم ، حيث أضيف الوزن الأول تدريجيا إلى 100 مل من المستخلص الخام مع التحريك

المستمر باستخدام المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer وفي درجة حرارة 4 م للحصول على نسبة إشباع من 0 – 30 نبذ المحلول بسرعة 7000 دورة \ دقيقة في درجة 4 م ، فصل المحلول الرائق وأخذ منه 100 مل أضيف إليه الوزن الأخر من كبريتات الامونيوم للحصول على نسبة الإشباع التالية ، وهكذا أعيدت العملية للتشبعات الأخرى للحصول على نسب إشباع (30 , 40 , 50 , 60 , 70 , 80 , 90) % ، قدرت الفعالية الإنزيمية للرواسب لكل خطوة بعد إذابتها بـ 5 مل من محلول دارئ الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 7 (Harris,1989) .

ج . الديلزة : تمت إزالة الأملاح من المحلول الإنزيمي بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم ، حيث وضع 6 مل من الراسب في أنبوبة الديلزة واحكم إغلاقها ثم وضع في حوض يحتوي على محلول دارئ الفوسفات ذو أس هيدروجيني (7) ثم وضع في الثلاجة لمدة 24 ساعة ، ثم تم قياس الفعاليه الإنزيمية (Sanderson et al ., 2006) .

النتائج والمناقشة Results and Discussion :

العزل والتشخيص:

تم عزل 61 مسحة بلعوم من مرضى مصابين بأمراض الجهاز التنفسي العلوي (التهاب الحنجرة واللوزتين)لكلا الجنسين وبمختلف الأعمار للمدة من 2010/12/15 ولغاية 2011/3/17 .

جدول رقم (1) توزيع العزلات البكتيرية .

الجنس	الفئة العمرية	العدد	النسبة %
أنثى	10 – 20	5	8.2
	20 – 30	9	14.7
	30 – 40	8	13.1
	40 – 50	3	5.0
ذكر	15 – 25	12	19.7
	25 – 35	11	18.0
	35 – 45	8	13.1
	45 – 55	5	8.2
المـــــــجموع		61	100 %

زرعت المسحات مباشرة في مرق تربتون الصويا مع الازايد والبنفسج البلوري لتثبيط نمو كل من البكتريا ألسالبه لصبغة غرام والفطريات والمكورات العنقودية المتواجدة في التجويف التنفسي للإنسان ونميت على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم للتحري عن المستعمرات النموذجية للمسبحيات وملاحظة نوع التحلل Blood hemolysis . أظهرت نتائج التشخيص البكتيري أن العزلات تعود إلى خمسة أنواع بكتيرية ضمن جنس *Streptococcus* بالاعتماد على الصفات المظهرية والزرعية وهذه الأنواع مبينة في جدول رقم (2) . وقد أظهر نوعان فقط تحلل الدم نوع بيتا أما الأنواع الأخرى فقد أظهرت تحللا من نوع ألفا . تم الحصول على عزلتين من المسبحيات المحللة للدم نوع بيتا أي بنسبة 3.3 % وهذا اقل مما حصل عليه العاني(2001)حيث

تمكن من الحصول على 12 %عزله من المسبحيات الحالة للدم نوع بيتا من مسحات اللوزتين. وقد يعود اختلاف نسبة عزل المسبحيات المحللة للدم إلى اختلاف المواقع الجغرافية للعزل واختلاف الطرائق والتقنيات المستخدمة في العزل وفي هذا البحث تم اختيار وسط مرق تربتون الصويا مع إضافة الازايد والبنفسج البلوري لتحويله إلى وسط انتقائي(Selective media)بالاعتماد على ماتوصلت إليه الشبيب(1977) من أن وسط تربتون الصويا هو الأفضل لعزل المسبحيات من مصدري الحنجرة واللعاب إذ تبلغ النسبة الايجابية له 93% و 96% على التوالي وهي أعلى من بقية الأوساط . تم التحري عن قابلية المسبحيات على إنتاج الستربتوكاينيز وأظهرت جميع العزلات التابعة للنوعين *S.pyogenes* و *S.equi* القدرة على إنتاج هذا الإنزيم في حين لم تتمكن أي من العزلات التابعة للأنواع الأخرى من أنتاجه . وبذلك تكون نسبة بكتريا *S.pyogenes* و *S.equi* المنتجة للإنزيم 100 % وهذا ماتوصلت إليه البغدادي (2006) وهي أعلى من النسبة التي حصلت عليها الشبيب (1977) والتي وجدت بأن 86 % من المسبحيات التابعة للنوع *S.pyogenes* 26.92 % من المسبحيات المحللة للدم بيتا المعزولة من الأطفال منتجة للإنزيم وعيسى (2000) التي وجدت بأن 85.18 % من العزلات المعزولة من البلعوم منتجة للإنزيم .

جدول (2) أعداد ونسب المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي .

النوع	العدد	النسبة المئوية %
S.pyogenes	16	26.2
S.mitis	10	16.3
S.equisimilis	15	24.5
S.suis	9	14.6
S.salivarius	11	18.4
المجموع	61	100 %

جدول (3) التوصيف الكيموحيوي للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي .

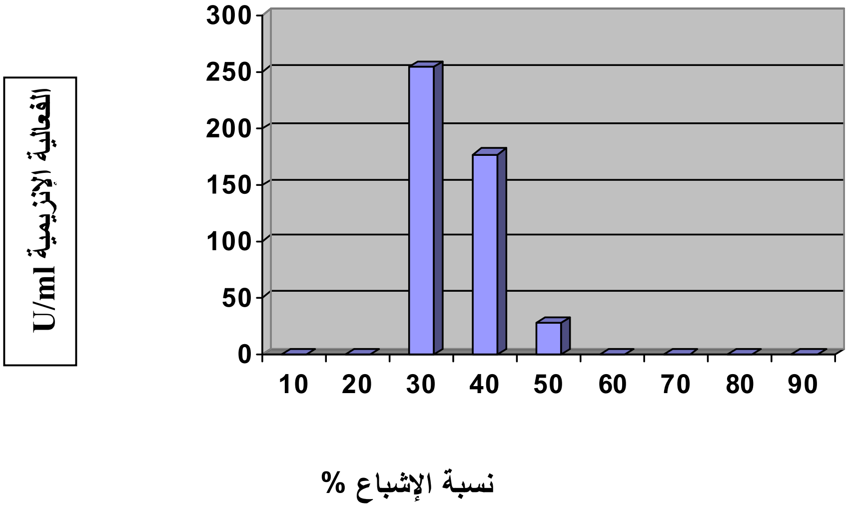
الاختبار	***S.pyogenes***	***S.mitis***	***S.equi***	***S.salivarius***	***S.suis***
نوع تحلل الدم	β	α	β	α	α
فحص الكتليز	_	_	_	_	_
اختزال النترات	_	_	_	_	_
النمو بوجود CO_2	+	+	+	+	+
النمو الاهوائي	+	+	+	+	+
الحساسية للبستراسين	S	R	R	R	R
الحساسية لـ SXT	R	S	S	S	S
الحساسية للاوبتوكين	R	R	R	R	R
النمو بدرجة 10 م	_	_	_	_	_
النمو بدرجة 45 م	_	+	_	_	_
تحمل الملوحة	_	_	_	_	_

النمـــو فــــي أمــــلاح الصفراء بتركيز 40%	_	_	_	+	+
تخمر اللاكتو ز	+	+	+	+	+
تخمر الانيولين	_	_	_	+	+
تخمر المانتول	_	_	_	_	_
تخمر الرافينوز	_	_/+	+	+	_
تخمر الرايبوز	_	_/+	+	+	+
تخمر السالسين	+	+	+	+	+
تخمر السوربتول	_	_	_	_	_
تخمر التريهالوز	+	+	+	+	+
فحص أنتاج الأسيتون	_	_	_	_	_

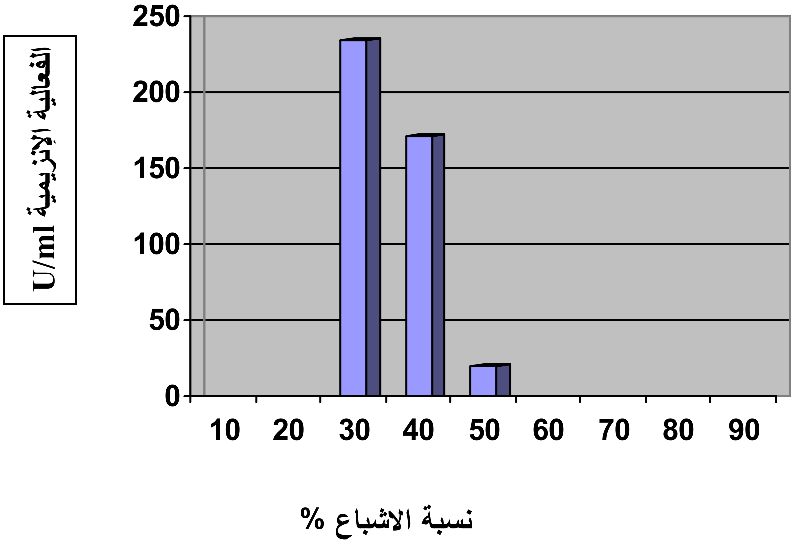
β و α نوع التحلل الدموي ، + نتيجة الفحص موجبة ، S حساس ، _ نتيجة الفحص سالبة ، R مقاوم .

تنقية إنزيم الستربتوكاينيز :

حيث تم ترسيب الإنزيم بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 80 % ولم تكن هذه الطريقة مجدية في تركيز الإنزيم ، أما عند التجزئة بكبريتات الامونيوم بنسب إشباع مختلفة تراوحت من 0 – 90 % فقد أعطى الإنزيم أعلى فعالية عند النسبة من 0 – 30 % بلغت (254.344U/ml) ، تلتها النسبة من 30 – 40 % بلغت فعاليتها (176.625U/ml)، أما النسبة 40– 50 % بلغت فعاليتها(28.26U/ml) ، أما بقية التشبعات لم تعطي فعالية تذكر،و من النتائج التي حصلنا عليها نجد انه من الافضل ان تبدا عملية الترسيب التجزيئي عند 20 % ثم عند 40 % لترسب معظم الإنزيم .



شكل (1) الفعالية الإنزيمية بعد التنقية بكبريتات الأمونيوم لبكتريا *S.pyogenes*



شكل (2) الفعالية الإنزيمية بعد التنقية بكبريتات الامونيوم لبكتريا *S.eqisilimilis*

يجرى عادة تركيز الإنزيمات في خطوات التركيز الأولى للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وللحصول على درجة من النقاوة، وتستخدم الأملاح عموماً لهذا الغرض كأملاح الأمونيوم والصوديوم في شكل كبريتات أو كلوريدات في الغالب، أو المذيبات العضوية كالكحول الاثيلي والأسيتون ويحدث الترسيب بالأملاح بسبب معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين ويؤدي ذلك إلى انخفاض ذائبية البروتين وترسبه وتسمى هذه العملية التمليح الخارجي (Salting out) . كما و يعتمد تركيز الملح الذي يودي إلى ترسيب البروتين على عدد وتوزيع شحنات البروتين والمجاميع الكارهة للماء كما ويوثر حجم البروتين وشكله ووجود مركبات أخرى معه في ذائبيته (White *et al.*,1973) . إن قلة الفعالية الإنزيمية عند الترسيب بتشبع 80% قد يكون ناتجا من ترسب بروتينات أو مواد أخرى قد أدت بشكل أو بأخر إلى فقدان الفعالية الإنزيمية . هذا ما تؤكده نتائج الترسيب ألتجزيئي إذ تبين إن حوالي 77% من البروتينات الكلية الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام قد ترسبت بنسب التشبع 30-50 %. هذا بدوره قد أدى إلى زيادة كبيرة في الفعالية النوعية للإنزيم ونقاوته بالمقارن مع الترسيب بالتشبع 80% . كما أن ترسب الإنزيم بالتشبعات العالية 60-80 % دون النسب الواطئة قد يكون بسبب احتوائه على مجاميع كارهة للماء قليلة نسبيا على سطحه الخارجي (Harris,1989). أما إزالة الأملاح من المحلول الإنزيمي فتمت بعملية الديلزة Dialysis وتعد هذه العملية أفضل من إزالة الأملاح بواسطة هلام Sephadex G25 ، حيث يعد تخفيف العينة احد مساوئ إزالة الأملاح بالترشيح الهلامي (Harris 1989)، فقد بلغ قياس الفعالية الإنزيمية بعد عملية الديلزة (490.625U/ml) ، وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل إليه Dubey et al (2011) حيث درس فعالية الإنزيم المعزول من *S.eqsimilis* وكانت فعاليته (467.73 U/ml) .

المصادر

البغدادي ، إسراء عدنان (2006_) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمسبحيات المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي العلوي . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بابل .

الشبيب ، أسفار شهاب (1977) . دراسة بكتيرية وراثية عن *Streptococcus pyogenes* المعزولة من حناجر ولعاب الأطفال في العراق . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

العاني ، ندى عربي حمدو (2001) . دراسة المستضد الخارق المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال على بعض الخلايا المناعية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد

عيسى ، مي طالب فليح (2000) . دراسة على إنزيم الـ Cystein protease المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes*. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

Adinarayana K . Bhavani DR . and Vinjamuri S . (2008) . Urokinase strong plasminogen activator . Biotecnol . Mol . Rev . ***3***:58-70 .

Banerjee , A ., Chistic , Y . and Banerjee , U . C . (2004) . Streptokinase . aclinically useful thrombolytic agent . Biotechnol . Adv . ***22***:287-305 . Ben Nasr , A ., Wistedt , A ., Ringdahl , U ., and Sjobringu . (1994) . Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M – like proteins . Eur . J Biochem , ***222***:267-276

Chitte , RR ., and Dey S . (2000) . potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain St 5 . Lett . Appl . Microbiol . ***31***:405-410 .

Dubey , R ., Kumar , J ., Agrawala , T ., Pusb , P ,. (2011) . Isolation , Production , Purification , Assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokmace , Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources . Afr . J Biotechnol . **10**:1480-1420 .

Harris , E ., L . V ,. (1989) . Concentration of the extract . In " Protein durification methods . E . L . V . Harris , and S . Angal , edt . " . Oxford Uni . Press . ***154***:34-43.

Jian , Cl ., Galindo , V ., Pancholi , V . L , Popov , Y ., Zhao , C ., Chopra , A ., (2003) . Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth condition of Aeromonas hydrophila . Microbial pathogenesis . ***34***:195-204 .

Kumar , S. , Thamura , K ., and Nie , M . (2004) . Effect of human plasminogen by streptokinase . J . Biol . Chem . ***2***:20-24 .

Ko , D ., Kim , I ., Lee , S . and Byun , S . (1995) . High – level expression and secretion of streptokinase in *Escherichia coli* . Biotechnol Lett . ***17***:1019-24 .

Kauusella , P ., Ullberg , M ., Sakela , O . and Kronvall , G ., (1992) . Tissue – type plasmogen activator mediated activation of plasminogen on the surface of group A , C , G streptococci . Infect . Immun . ***60***:196-201 .

Kumanmneni , A ., Abdergham , T ., and Elliaiah , P . (2007) . Streptokinase-the rug of choice for thrombolytic therapy . J . Thromb . Thrombolylysis . ***23***:9-23 .

Lizano , S . and Johnston , K . (2005) . Structural diversity of streptokinase and activation of human plasminogen . Infect. Immun . *73*:4451-4453 .

Mohammad B , Hossain M , and Mohammad , R . (2009) . Production and purification of streptokinase by protected affinity chromatography . Avicenna J . Med . Biotecnol . **1**:47-58

Macfaddin , J . F . (2000) . Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria. 3rd edition . The Williams and Wilkins . Baltimor , USA .

Parrado J , Conejero – Lara F , Smith R . A . J ., Marshall J . M ., Ponting C . P . and Dobson C . M . (1996) . The domain organization of streptokinase nuclear magnetic resonance , circular dichroism , and functional characterization of protealytic fragments . Protein Sci . ***5***:693-704 .

Rodriguez , P , Fuentes , P , Barro , M ., Alvarez , G ., Munoz , E , Collen , D . and Lijnen , R ., (1995) . Structural with plasmimogen . Eur . J Biochem . ***229***:83-90 .

Sanderson , M ., Batzolf , M ., Dowton , K ., and Ranson J . (2006) . Divergence in the plasminogen-binding group a streptococcal M protein family . J . Biol . Chem . ***231***:3217-3224 .

Sherry , S . and Marder , B . (1991) . Streptokinase and recombinant tissue plasminogen activator (rt – PA) are equally effective in treating acute myocardial infarction . **114**:417-23

Stukus , P , E . (1997) . Investigating microbiology a laboratory manual for general microbiology . Harcout Brace and companes

Wakeham N , Terzyan S , Loy J . A . Tang J . Zhang X . C . (2002) Effect of deletion of streptokinase residues 48-59 on plasminogen activation . Protein Engineering . ***15***:723-761 .

White , A ., Handler , P ., and Smith , E ., (1973) . Principles of biochemistry . 2ed . ed Mc Grow – Hill Book Company , Ablakiston Publication , New York .