NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/43 , 2021

Scan online to view this article

Recombinant Production of metalloproteinase domain of Ecarin as the main activator of prothrombin

Nasrin Mohammadi [1], Mojgan Bandehpour [2,3], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[1], Bahram Kazemi [2,3*]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Today, many patients with coagulation disorders due to defective or non-functioning coagulation factors and the use of various blood thinners need to check their prothrombin total and quantify determination of direct thrombin inhibitors. Despite the study of the ecarin from *Echis carinatus* venom as a direct activator of prothrombin, there have been not investigations into the active site of this enzyme.

Material and methods: Ecarin metalloproteinase domain (639 bp) was synthesized into the pcDNA3.1. Recombinant plasmid was transfected into HEK293 cell line. Protein expression was evaluated using SDS-PAGE and its function in reaction with prothrombin and using a prothrombin time test was measured.

Results: The results showed that the metalloproteinase domain of ecarin produced in the HEK293, like whole ecarin, was able to activate prothrombin to thrombin; but its activity was slow than one produced in the prokaryotic system.

Conclusion: In this study, the recombinant ecarin metalloproteinase produced in HEK293 cells, like whole ecarin, was able to activate prothrombin to thrombin and was introduced for the first time as a suitable alternative to both natural and recombinant ecarin in methods based on prothrombin to thrombin conversion.

Key words: Ecarin, Metalloproteinase domain, Active site, HEK293 cells, Iau Science .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

Corresponding author:
Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: bahram_14@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۳ - تابستان ۱۴۰۰

NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تولید نوترکیب دمین متالوپروتئیناز ایکارین به عنوان فعال‌کننده اصلی پروترومبین در سلول HEK293

نسرین محمدی[۱]، مژگان بنده‌پور[۲،۳]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌اللهی[۱]، بهرام کاظمی[۲،۳*]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه بیماران زیادی به‌دلیل نقص یا عدم عملکرد فاکتورهای انعقادی و استفاده از انواع داروهای رقیق‌کننده خون درگیر اختلال‌های انعقادی بوده و نیازمند بررسی کل پروترومبین و تعیین مقدار بازدارنده‌های مستقیم ترومبین هستند. با وجود مطالعه روی ایکارین سم مار جعفری، به‌عنوان یک فعال‌کننده مستقیم پروترومبین، هنوز در مورد مکان فعال این آنزیم تحقیق و بررسی انجام نشده است.

مواد و روش‌ها: دمین متالوپروتئیناز ایکارین با طول ۶۳۹ جفت باز در وکتور pcDNA3.1 سنتز گردید و پلاسمید یوکاریوتی نوترکیب به رده سلولی HEK293 انتقال یافت. با استفاده از روش SDS-PAGE بیان پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت و عملکرد آن در واکنش با پروترومبین و با استفاده ازتست زمان پروترومبین سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که دمین متالوپروتئیناز ایکارین تولید شده در سیستم بیانی HEK293 ، مانند ایکارین کامل، قادر به تولید ترومبین از پروترومبین است. اما در مقایسه با پروتئین مشابه تولید شده در سیستم پروکاریوتی، شروع فعالیت آن آهسته بود.

نتیجه‌گیری: دراین بررسی دمین متالوپروتئینازی ایکارین که به‌صورت نوترکیب در سلول‌های HEK293 تولید گردید، همانند ایکارین کامل قادر به فعال کردن پروترومبین به ترومبین بود و برای اولین‌بار به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای هر دو نوع ایکارین طبیعی و نوترکیب در روش‌های مبتنی بر تبدیل پروترومبین به ترومبین معرفی شد.

واژگان کلیدی: ایکارین، دمین متالوپروتئیناز، مکان فعال،سلول‌های HEK293، Iau Science.

مقدمه

سم مارها مجموعه‌ای از پروتئین‌ها و پپتیدهای فعال دارویی هستند که به‌عنوان ابزار دفاعی برای به دام انداختن و از بین بردن هدف، مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی از این سموم دارای فعالیت آنزیمی هستند و مولکول‌های بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها را تجزیه کرده و باعث انعقاد خون می‌شوند (۱).

ایکارین پروتئازی است که از سم مار جعفری[1] مشتق شده است. به‌طور اختصاصی پروترومبین[2] را به ترومبین فعال کرده و باعث لخته‌شدن خون می‌گردد (۲). در حالت نرمال فرم کربوکسیله پروترومبین در بدن انسان به ترومبین تبدیل می‌شود. اما ایکارین نه تنها قادر به شناسایی و فعال‌سازی پروترومبین کربوکسیله شده و دکربوکسیله (فرم غیرطبیعی پروترومبین پس از مهار عملکرد ویتامین K

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: bahram_14@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

[1] *Echis carinatus*
[2] Prothrombin

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

تولید می‌شود) است، بلکه مقادیر پایین پروترومبین را به مزوترومبین[3] تبدیل می‌کند. این خاصیت منحصر به فرد ایکارین باعث شده است که به‌طور اختصاصی برای تعیین سطح پروترومبین دکربوکسیله پلاسما در افراد مبتلا به بیماری کبد، انعقاد پروترومبین مادرزادی[4]، بیماران سرطانی مورد استفاده قرار گیرد (۶-۳). در سال ۲۰۱۰ ایالات متحده داروی دابیگاتران[5] را به‌عنوان یک مهارکننده مستقیم خوراکی ترومبین و جایگزین وارفارین[6]، برای پیشگیری از سکته مغزی، درمان ترومبوز ورید عمقی[7] (DVT) و آمبولی ریوی[8] (PE) معرفی نمود که پس از آن نیاز واقعی به آزمایش مبتنی بر ایکارین در این بیماران بوجود آمد (۷).

ترومبین یکی از مهم‌ترین فاکتورهای انعقاد خون است. امروزه، در بیوتکنولوژی صنعتی، از ترومبین برای تولید منعقدکننده و پانسمان زخم استفاده می‌شود. تاکنون، از ترومبین فعال (آلفا-ترومبین[9]) مشتق شده از خون گاو برای این منظور استفاده شده است. اما به‌دلیل خطر انتقال بیماری‌های احتمالی (به‌ویژه بیماری‌های منتقله از طریق پریون‌ها[10]) از خون گاو و احتمال انتقال بیماری‌های ویروسی؛ مانند ایدز، هپاتیت B و هپاتیت C از طریق ترومبین مشتق شده از خون انسان استفاده از ترومبین نوترکیب برای جلوگیری از واکنش‌های ایمنی نامطلوب پیشنهاد شده است. دانشمندان با تولید ایکارین نوترکیب و واکنش اختصاصی آن با پروترومبین قادر به تولید ترومبین نوترکیب هستند (۸).

ایکارین پروترومبین انسانی را از بین اسیدآمینه‌های[11] Arg320-Ile321 شکافته و تولید مزوترومبین و سپس α-ترومبین ، فرم بالغ و فعال ترومبین، می‌کند (۹).

ساختار گلیکوپروتئین ایکارین شامل یک منطقه اختصاصی به نام دمین کاتالیزوری متالوپروتئیناز با مناطق شلاته-کننده یون‌های روی (Zn^{2+}) است و به‌عنوان مکان فعال آنزیم شناخته شده است. برخی از پروتئین‌ها توسط مکان فعال این آنزیم شناسایی و برش داده می‌شوند. در حقیقت، این محل کاتالیزوری و فعال آنزیم است که پروتئین‌ها و پپتیدها را پس از توالی اسیدهای آمینه Asp-Gly-Arg یا Glu-Gly-Arg برش داده و با شکستن پیوند بین Arg320-Ile321 به دو زنجیره A و B توالی‌های طولانی‌تری مانند پروترومبین را می‌شکافد و آن را به مزوترمبین و سپس به ترومبین تبدیل می‌کند (۱۰،۱۱). ایکارین یک پروتئین یوکاریوتی است و باید توسط سیستم بیانی یوکاریوتی سنتز شود. با این حال ، هدف از مطالعه ما تولید دمین متالوپروتئیناز ایکارین در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و مقایسه آن با پروتئین مشابه تولید شده در سیستم پروکاریوتی از نظر کارایی و مقرون به صرفه‌بودن تولید ترومبین بود.

مواد و روش‌ها

تولید دمین متالوپروتئیناز ایکارین در سلول‌های HEK293[12]

کدون‌های توالی ایکارین متالوپروتئیناز[13](*Ecarin–met*) با طول ۶۳۹ جفت باز برای بیان در سلول‌های پستانداران بهینه‌سازی شده و در MCS[14] وکتور pCDNA 3.1 توسط شرکت GenScript سنتز شد. پلاسمید نوترکیب سنتز شده داخل سلول‌های TOP10 تکثیر شد سپس توسط دستگاه اپندورف مولتی پوراتور[15] با ولتاژ ۲۲۰ ولت در دمای ۴ °C به‌مدت ۵۰۰ میکروثانیه به رده سلولی HEK293 ترانسفکت گردید. به‌طوری‌که قبل از الکتروپوریشن[16] حدود ۱ میلیون سلول HEK293 با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. بعد از الکتروپوریشن سلول‌ها در محیط کشت RPMI[17] حاوی ۱۰٪ سرم FBS[18] و ۱۰۰ µg/ml آنتی بیوتیک نئومایسین به‌مدت ۴۰ ساعت در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷° C، رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ CO2 رشد داده شدند به‌طوری‌که بررسی

[3] Mesothrombin
[4] Dysprothrombinemia
[5] Dabigatran
[6] Warfarin
[7] Deep vein thrombosis
[8] Pulmonary embolism
[9] α-thrombin
[10] Prions
[11] Residues

[12] Human embryonic kidney 293 cells
[13] *Ecarin metalloprotease*
[14] Multiple Cloning Site
[15] Eppendorf Multiporator device
[16] Electroporation
[17] Roswell Park Memorial Institute Medium
[18] Fetal bovine serum

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

میکروسکوپی سلول‌های ترانسفکت تکثیر شده نشانگر وجود پلاسمید مقاوم‌به آنتی‌بیوتیک نئومایسین در آن‌ها بود. پروتئین‌ها با استفاده از روش TCA[19] مطابق پروتکل مندرج در Sanchez, L.2001 رسوب‌گیری شدند (۱۲). برای ارزیابی با روش SDS-PAGE، نمونه‌های کشت سلولی رسوب داده شد و بر روی ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز گردید.

ارزیابی پروترومبین فعال شده توسط r-ecarin-met

برای تعیین فعالیت متالوپروتئیناز ایکارین نوترکیب[20] (r-ecarin-met) تولید شده، هضم پروترومبین با استفاده از این آنزیم انجام شد. ۱۰ µl از r-ecarin-met با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۰ µl از پروترومبین نوترکیب با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (تولید شده در آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهید بهشتی) در بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH=8، ۱۰۰ میلی-مولار NaCl و ۰/۱ میلی‌گرم BSA[21] مخلوط شد و در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه هضم شده توسط ژل SDS-PAGE[22] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت r-ecarin- met با آزمایش زمان پروترومبین

سنجش زمان پروترومبین[23] (PT) برای r-ecarin-met تولید شده انجام شد. ۵ میلی‌لیتر خون از یک فرد نرمال جمع‌آوری شد و سپس به یک لوله حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم ۳/۲٪ منتقل شد. نمونه خون با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا پلاسمای غنی از پلاکت[24] (PRP) مورد نیاز به‌دست آید. ۲۰ میکرولیتر از هر r-ecarin-met تولید شده در هر دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی (۰/۵ نانوگرم در میکرولیتر) در لوله‌های استریل جداگانه ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما به هر دو لوله اضافه شد. سپس در هر یک از لوله‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر بافر PT (لیکوسفال بهار افشان، ایران) و ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدکلسیم ($CaCl_2$) ۰/۰۲۵ مولار، از قبل گرم شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اضافه شد. زمان مورد نیاز برای تشکیل لخته در هر لوله با استفاده از زمان‌سنج اندازه‌گیری شد و آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید.

[19] Tricholoroacetic acid
[20] Recombinant ecarin metalloproteinase
[21] Bovine serum albumin
[22] Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
[23] Prothrombin time
[24] Platelet-Rich Plasma

یافته‌ها

پلاسمید نوترکیب (*ecarin-met* / pCDNA3.1) به رده سلولی HEK293 ترانسفکت شد و پروتئین بیان شده توسط ژل SDS-PAGE ارزیابی شد. فعالیت آنزیمی r-ecarin-met نشان داد که این پروتئین می‌تواند پروترومبین را به ترومبین تبدیل کند (شکل ۱). فعالیت آنزیمی با استفاده ازتست آماری T-Test مستقل و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین زمان لخته‌شدن خون با r-ecarin-met که در سیستم بیانی یوکاریوتی تولید شده بود ۲/۵۱± ۲۷/۶ ثانیه (میانگین ± انحراف معیار) بود، در حالی‌که میانگین زمان لخته شدن خون با r-ecarin-met تولید شده در سیستم بیانی پروکاریوتی ۱/۹۷ ± ۲۰ ثانیه (میانگین ± انحراف معیارکه در این گزارش ذکر نشده است)، در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد ($P<0/05$) به‌دست آمد (نمودار ۱).

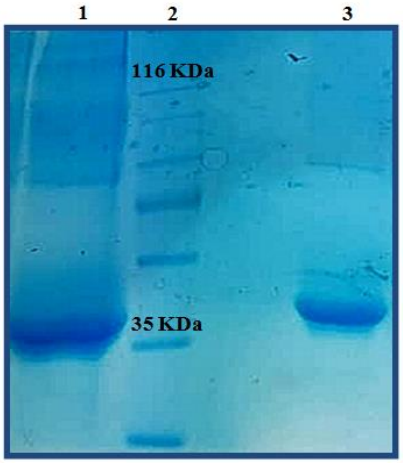
بحث

ایکارین بدون نیاز به کوفاکتورها و فعال‌کننده‌های معمول، پروترومبین کربوکسیله و دکربوکسیله را به ترومبین تبدیل می‌کند. این خاصیت منجر به استفاده از آن به‌عنوان معرف آزمایشگاهی منحصر به فرد شده است (۵).

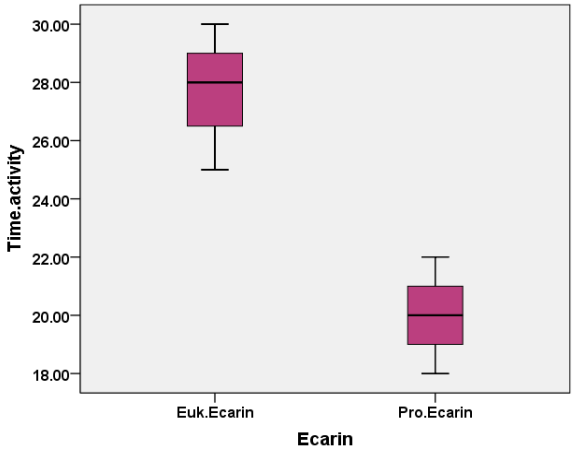
مطالعه‌های قبلی نشان داده است که ایکارین نوترکیب پروترومبین را سریع‌تر از نوع طبیعی به ترومبین تبدیل می‌کند و باعث لخته‌شدن خون می‌شود (۱۳،۴،۱۴). Jonebring و همکاران در سال۲۰۱۲ موفق به تولید پروتئین کامل ایکارین در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی شدند. آن‌ها گزارش دادند که پروتئین تولید شده در سیستم بیانی CHO از لحاظ پایداری و حلالیت بهتر از نوع پروکاریوتی است (۴). که این موضوع ممکن بود

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

به‌دلیل استفاده آن‌ها از پروتئین کامل با وزن مولکـولی بـالا در سیستم بیانی باکتریایی ایجاد شده باشد (۱۵،۱۶).



شکل ۱- واکنش دمین متالوپروتئینازی ایکارین تولید شده در HEK293 با پروترومبین نتایج الکتروفورز روی ژل ۱۲٪ پلی‌اکریل‌آمید
ستون ۱: محصول واکنش r-ecarin-met با پروترومبین با نسبت ۱۰:۲۰ (سایز باند مورد نظر ۳۵ کیلودالتونی است).
ستون ۲: مارکر وزنی پروتئین
ستون ۳: ترومبین تجاری (ترومبین تجاری است و امکان ایجاد اختلاف سایز با ۳۵ کیلودالتون مورد نظر را دارد).



نمودار ۱- مقایسه عملکرد ایکارین نوترکیب تولید شده در دو سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی
Euk. Ecarin: r-ecarin-met تولید شده در سیستم یوکاریوتی
Pro. Ecarin : r-ecarin-met تولید شده در سیستم پروکاریوتی
Time activity: زمان شروع فعالیت ایکارین‌ها (مقادیر میانگین سه تکرار است)

برطبـق گزارشـی از Nishida و همکـاران در سـال۱۹۹۵، دمـین متالوپروتئینـازی ایکـارین دارای یـک منطقـه شلاته‌کننده فلـز روی (-His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa--Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His-)، کـه مشـابه تـوالی محافظت‌شده در متالوپروتئینازهای شلاته‌کننده روی است. این منطقه حاوی آمینواسیدهای هیستیدین است کـه بـه‌عنوان مکان فعال در این آنزیم‌ها شناسایی شده اسـت(۱۰).

تاکنون هیچ گزارشی مبنی‌بر تولید دمـین متالوپروتئینـازی ایکارین در هیچ‌یک از سیسـتم‌هـای بیـانی وجـود نداشـته است.

یکـی از مزایـای اسـتفاده از رده‌هـای سـلولی انسـان در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک مربوط‌به تغییرهای پـس از

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

ترجمه (PTMs[25]) مانند گلیکوزیلاسیون[26] است که در تنظیم نیمه‌عمر پروتئین‌ها و اثرهای آن بر پایداری و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها، تشخیص لیگاند یا اتصال، ایمنی‌زایی و دیگر عملکردهای مهم دیگر نقش مهمی دارد. بنابراین رده‌های سلولی انسان پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای تولید این پروتئین‌ها هستند و سیستم بیانی آن‌ها در مقایسه با سایر رده‌های سلولی پستانداران از مزیت بیش-تری برخوردار است. در حال حاضر، امروزه بیوداروهای بیولوژیکی متعددی با استفاده از سلول‌های HEK-293 تولید می‌شود سرعت رشد بالا (ابزاری برای تولید داروهای بیولوژیکی) ، تراکم بالای سلول در فلاسک‌ها، متابولیسم کارآمد و انعطاف‌پذیری و امکان دست‌کاری ژنتیکی، باعث شدند که این سیستم بیانی برای تولید ایکارین ترانکت در سیستم یوکاریوتی انتخاب گردد (۱۷).

همواره محققان به‌دنبال تولید یک تست تشخیصی با خاصیت بالا، بدون آلودگی و هزینه‌های کم هستند که باعث واکنش اختصاصی آنزیم در برابر سوبسترا شود. تولید مکان فعال یک آنزیم به‌صورت نوترکیب به‌جای پروتئین کامل، در سیستم‌های بیانی، مشکل کاهش اندازه پروتئین و تغییرهایی پس از ترجمه پروتئین مانند disulfidation را می‌کاهد (۱۸).

ما نه تنها دمین متالوپروتئیناز ایکارین را در سیستم بیانی یوکاریوتی تولید کردیم، بلکه این پروتئین به‌عنوان مکان فعال آنزیم، توانست پروترومبین را به‌طور اختصاصی فعال کند. اگرچه نتایج نشان داد که، از نظر تبدیل پروترومبین به ترومبین، فعالیت r-ecarin-met تولید شده در سیستم بیانی پروکاریوتی سریع‌تر از نوع یوکاریوتی است (نمودار۱).

نتیجه‌گیری

با توجه‌به یافته‌های محققین در مورد عملکرد سریع‌تر ایکارین نوترکیب نسبت‌به ایکارین طبیعی و معرفی دمین متالوپروتئینازی ایکارین به‌عنوان مکان فعال این آنزیم در برش دادن اختصاصی پروترومبین و تبدیل آن به ترومبین در این بررسی برای اولین بار دمین متالوپروتئینازی ایکارین به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای هر دو نوع ایکارین طبیعی و نوترکیب در روش‌های مبتنی‌بر تبدیل پروترومبین به ترومبین پیشنهاد می‌گردد. البته مطالعه حاضر نتایج اولیه بررسی امکان تولید نوترکیب دمین متالوپروتئینازی ایکارین در سیستم بیانی یوکاریوتی است که برای بهینه‌سازی تولید آنزیم می‌توان از سایر موارد مؤثر مانند سیستم‌های بیانی و روش‌های تخلیص مختلف استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای نسرین محمدی دنشجوی دانشگاه آزاد اسلامی است. طرح تحقیقاتی مربوطه توسط مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طی گرنت شماره ۲۳۹۹۸ حمایت گردید). بدین طریق از تمامی افرادی که ما را در این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

[25] Post Translational Modifications
[26] Glycosylation

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

منابع

1. Kini R.M, C.Y Koh. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. Toxins 2016; **8**(10): 284.

2. Kornalik F, Vorlova Z. Ecarin test in diagnosis of dicoumarol therapy, liver diseases and DIC. Folia haemat. (Leipzig, Germany: 1928), 1988; **115**(4): 483.

3. Morita, T. and S. Iwanaga, Purification and properties of prothrombin activator from the venom of Echis carinatus. J. Biochem. 1978;**83**(2): 559-570.

4. Jonebring A., et al. Expression and characterization of recombinant ecarin. Protein J. 2012; **31**(5): 353-358.

5. Hutton R., D. Warrell. Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Rev. 1993; **7**(3): 176-189.

6. Franza Jr B., D. Aronson. Detection and measurement of low levels of prothrombin. Use of a procoagulant from Echis carinatus venom. Thromb. Res. 1976; **8**(3): 329-336.

7. Gosselin RC, Douxfils J. Ecarin based coagulation testing. AJH. 2020 Apr 19.

8. Olsen, D.R., et al. Ecarin prothrombin protease and methods. 2002; Google Patents.

9. Rhee, M.J., S. Morris, and D.P. Kosow, Role of meizothrombin and meizothrombin-(des F1) in the conversion of prothrombin to thrombin by the Echis carinatus venom coagulant. Biochem. 1982; (14) 21: 3437-3443.

10. Nishida S., et al. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) from Kenyan Echis carinatus venom. Biochem. 1995;. **34**(5): 1771-1778.

11. Yamada D., Sekiya F., Morita T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in Echis carinatus venom with a unique catalytic mechanism. J. Biol. Chem. 1996; 271(9): 5200-5207.

12. Sanchez L. TCA protein precipitation. Protocols on line, 2001.

13. Harrysson, A., Lövgren A. Method for production of recombinant human thrombin. 2012; Google Patents.

14. McClain S., Valasek M., Gruber A. Coordinated coexpression of thrombin. 2019; Google Patents.

15. Gupta SK, Shukla P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. Criti. Rev.Biotechnol. 2016 Nov 1;36(6):1089-98.

16. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol. Adv. 2009 May 1;27(3):297-306.

17. Hu, J., et al. Human embryonic kidney 293 cells: a vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. Cells Tissues Organs, 2018. 205(1): 1-8

18. Sahdev, S., Khattar S.K., Saini K.S Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol. Cell. Biochem. 2008; **307**(1-2): 249-264.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.43.3.5]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]