

Production of a Mutated Iranian Luciferase by SDM for Using in Medical Diagnostic Assays

Received: 1 February 2015

Revised: 4 May 2015

Accepted: 20 May 2015

ABSTRACT

Zahra Sobhani Damavandifar¹
Saman Hosseinkhani^{2*}
Reza Hassan Sajedi³

¹PhD Student, Biochemistry, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Professor, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³Associate Professor, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:

Saman Hosseinkhani
Tel: (+98)2182884407

e-mail: saman_h@modares.ac.ir

Background: In the bioluminescence phenomenon which has been observed in many organisms, a luciferase catalyzes the oxidation of luciferin to oxyluciferin and a visible light is produced. Light production of luciferase is one of the most sensitive tools in the detection of ATP for measuring microbial contamination, study of protein-protein interactions in cells and construction of biosensors and genetic bioreporters. In spite of these applications, the weakness of firefly luciferase is its rapid inactivation. Many studies have been done to develop thermostable luciferases by site directed mutagenesis. One of these modifications was LRR mutant in which the Leu300 was substituted with Arg in the E³⁵⁴RR³⁵⁶ *Lampyris turkestanicus* luciferase as template. LRR was more thermostable than the wild-type but with only 0.02% activity.

Materials and Methods: In this research by using the method of site-directed mutagenesis, glutamate 270 was substituted with alanine in LRR mutant as template. The kinetics parameters of the mutated enzyme were determined and its structural characteristics were also investigated with fluorescence and CD spectroscopy.

Results: The kinetics results revealed that the mutant 270 was more active than LRR. Furthermore the structural studies showed the significant changes in secondary and tertiary structures in the mutated enzyme in comparison with LRR and wild-type samples.

Conclusion: The 270 mutant was more active than the LRR and it is recommended that this mutant be used in medical assays kits production.

Keywords: luciferase, site-directed mutagenesis, enzyme activity, three dimensional conformation

تولید آنزیم لوسیفراز ایرانی جهش یافته به روش SDM با کاربرد تشخیص بالینی

تاریخ دریافت: ۱۲ دی ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح: ۱۴ اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

زهرا سبحانی دماوندی^۱
سامان حسینخانی^{۲*}
رضا حسن ساجدی^۳

^۱ دانشجوی دکتری، بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۲ آستاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۳ دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

مقدمه: آنزیمی که واکنش بیولومینسانس یا نشر نور را در تعدادی از موجودات کاتالیز می کند لوسیفراز نام دارد. از واکنش کاتالیز شده توسط این آنزیم می توان در بسیاری از سنجش های تشخیص طبی از جمله سنجش مقدار ATP در محیط، کیت های تشخیصی بر پایه لوسیفراز، تعیین مقدار آلودگی میکروبی در یک محیط، ساخت بیوسنسورها و گزارشگرهای زیستی استفاده نمود. در جهت پایدارسازی آنزیم با کمک روش جهش زایی هدف دار، لوسیفراز های نوترکیب مختلفی ساخته شده اند. یکی از این آنزیم ها با جهش L^{300R} بر جهش یافته ERR ($E^{354}RR^{356}$) لوسیفراز ایرانی *L.turkestanicus* به دست آمد که جهش یافته LRR (ERR/L^{300R}) نام گذاری شد. این آنزیم اگرچه نسبت به آنزیم طبیعی به حرارت مقاوم تر بود، اما تقریباً غیرفعال بود. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی امکان فعال سازی مجدد آنزیم غیرفعال شده LRR با کمک روش جهش زایی هدف دار جهت استفاده از آنزیم های جهش یافته در ساخت کیت های سنجش ATP و دیگر آزمایش های زیستی بوده است.

مواد و روش ها: در این تحقیق با روش جهش زایی هدف دار اسید آمینه گلوتامات ۲۷۰ در آنزیم LRR به آلانین تبدیل شد. سپس مطالعات سینتیکی آنزیم انجام شد و خصوصیات ساختاری جهش یافته فوق نیز به وسیله تکنیک های فلورسنت و CD بررسی گردید.

یافته ها: نتایج بررسی های سینتیکی نشان داد که آنزیم جهش یافته ۲۷۰ فعال تر از LRR می باشد. همچنین مطالعات ساختاری نشان داد که آنزیم فوق هم از لحاظ ساختارهای دوم و هم ساختار سوم پروتئین، تغییرات عمده ای نموده است.

نتیجه گیری: با جهشی که در جهش یافته ۲۷۰ اعمال و سبب فعال تر شدن نسبی آن در مقایسه با LRR شد، پیشنهاد می شود بتوان از آنزیم ۲۷۰ در ساخت کیت های سنجش بالینی استفاده نمود.

کلید واژه ها: لوسیفراز، جهش زایی نقطه ای (SDM)، فعالیت آنزیمی، ساختار سه بعدی

مقدمه

ATP و Mg^{2+} به اکسی لوسیفیرین پرنرژی تبدیل می کند و این ماده انرژی خود را به شکل نور مرئی ساطع کرده، به حالت پایه می رسد. به عبارت دیگر در این فرایند انرژی شیمیایی به انرژی نورانی تبدیل می شود [۱]. واکنش کاتالیز شده توسط لوسیفراز، کاربردهای گسترده ای در علوم مختلف زیست شناسی دارد.

بیولومینسانس پدیده ایست که طی آن در تعدادی از موجودات زنده شامل باکتری ها، قارچ ها، ماهی ها و حشرات نشر نور رخ می دهد. آنزیم مؤثر در این پدیده لوسیفراز است که لوسیفیرین را در حضور

یافته و منجر به نشر نور قابل ردیابی می‌گردد [۵]. در صنایع تخمیر نیز، یک ژن گزارشگر بیولومینسانسی وارد پلاسمید دارای ژن کد کننده محصول تخمیر شده و قادر به ردیابی دقیق محصول تخمیر و کنترل فرایندها می‌باشد [۶].

کاربرد دیگر لوسیفراز ردیابی بیان ژن‌ها می‌باشد. در این تکنیک، الگوهای بیان ژن در حیوانات تراریخته تولیدکننده نور مطالعه می‌شوند. از این الگوها می‌توان در توسعه و کشف داروها و مدل سازی بیماری‌های انسانی استفاده نمود [۸ و ۷].

در راستای فعال سازی مجدد این جهش یافته و با هدف استفاده از آنزیم فوق در سنجش ATP، با استفاده از روش جهش زایی هدف دار^۱ و با تکنیک QuickChange PCR جهش‌های متعددی بر این آنزیم اعمال شده است [۹]. با توجه به اینکه مشخص شده است که آنزیم‌های ترموفیل نسبت به آنزیم‌های مزوفیل تعداد بیشتری آمینواسید آرژنین در لوپ‌های سطحی خود دارند [۱۰]، بر این اساس در یک تحقیق از لوسیفراز گونه ایرانی Lampyris turkestanicus که یک پروتئین تک زنجیره‌ای است و ۵۴۷ آمینواسید دارد، به وسیله تکنیک جهش زایی هدف دار، نمونه جهش یافته LRR (E³⁵⁴RR³⁵⁶L³⁰⁰R) به دست آمد [۱۱] که اگرچه این آنزیم نسبت به آنزیم طبیعی به حرارت مقاوم تر شده بود اما فعالیت آن به ۰/۰۲ درصد آنزیم طبیعی رسیده بود. پیشنهاد گردید پیوند یونی تشکیل شده بین آرژنین ۳۰۰ و گلوتامات ۲۷۰ سبب کاهش انعطاف ساختار آنزیم در آن ناحیه شده که به علت نزدیکی محل پیوند فوق به جایگاه فعال، از انعطاف پذیری جایگاه فعال نیز کاسته شده و فعالیت آنزیم به حداقل رسیده است [۱۱]. این تحقیق، در جهت ارزیابی فعال سازی آنزیم LRR غیرفعال با روش جهش زایی هدف دار بوده است. بر این اساس با جهش گلوتامات ۲۷۰ به آلانین و حذف پیوند یونی مذکور فعالیت و خواص طیفی، ساختاری و مدلینگ آنزیم جدید بررسی گردید. آمینواسید آلانین به این دلیل انتخاب شد که کوتاه‌ترین زنجیر جانبی هیدروفوب را داراست و ممانعت فضایی ایجاد شده توسط آن در محل قرارگیری اش حداقل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمک سدیم د-لوسیفرین، ATP، ANS، مواد محیط کشت، PrimeSTAR HS DNA Polymerase و DpnI

یکی از مهم‌ترین کاربردهای لوسیفراز، تعیین مقدار ATP در یک محیط به عنوان شاخصی از مقدار آلودگی میکروبی و تعداد سلول‌های زنده در یک محیط می‌باشد. به عنوان مثال سنجش آلودگی اندک میکروبی در آب، شیر، ادرار و خاک که در بیوتکنولوژی و صنایع غذایی کاربرد زیادی دارد. همچنین از سنجش مبتنی بر بیولومینسانس در مطالعه میزان اثرگذاری آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها و تأثیر داروهای ضدسرطان بر سلول‌های بدخیم استفاده می‌گردد [۳ و ۲].

یکی از کاربردهای مهم لوسیفراز، سنجش آنالیت‌ها در تست‌های ایمنی ELISA می‌باشد [۴]. در نوعی از این تست‌ها از پروتئین ادغامی استرپتوآویدین-لوسیفراز استفاده می‌شود. در نوع تست ساندویچی، ابتدا دو آنتی‌بادی علیه دو اپی‌توپ مختلف آنتی ژن ساخته شده، پلیت با یکی از آنتی‌بادی‌ها پوشیده می‌شود و سپس آنتی ژن به آن اضافه می‌گردد. پس از آن آنتی‌بادی نشان‌دار شده با بیوتین به آن اضافه و در آخر با افزودن پروتئین ادغامی استرپتوآویدین - لوسیفراز به خانه‌ها، مقدار آنتی ژن در نمونه توسط لومینومتر سنجش می‌شود. در این سنجش شدت نور با غلظت آنتی ژن متناسب است. این روش برای سنجش مقدار آنتی ژن‌های ویروسی و مارکرهای توموری مناسب است.

در تست‌های ELISA رقابتی، آنتی ژن مورد نظر با آنتی ژن متصل شده با بیوتین برای اتصال به آنتی‌بادی پوشش داده شده در کف پلیت رقابت می‌کنند. هر چه غلظت آنتی ژن در نمونه بیشتر باشد مقدار کمتری آنتی ژن بیوتینه به آنتی‌بادی متصل می‌شود. سپس غلظت آنتی ژن متصل به بیوتین با افزودن کوئزوگه استرپتوآویدین - لوسیفراز با لومینومتری تعیین می‌شود. این روش برای سنجش غلظت‌های زیاد آنتی ژن‌های هورمونی و استروئیدی مناسب است [۴].

کاربرد دیگر بیولومینسانس در بررسی اتصال گیرنده‌ها به لیگاند خود می‌باشد که بر اساس تکنیک انتقال انرژی رزونانس (BRET) می‌باشد. این تکنیک کاربرد مهمی در بررسی میان‌کنش‌های پروتئین‌ها با یکدیگر در سلول‌های زنده دارد. در این فرایند اگر دو پروتئین مورد نظر که هر کدام جداگانه به لوسیفراز و GFP متصل هستند با هم میان‌کنش کنند، لوسیفراز در حضور سوبسترای خود نشر بیولومینسانسی داشته که این انرژی به پروتئین GFP انتقال

انکوباسیون سلول‌ها در ۲۲ درجه سانتی‌گراد)، در سلول‌ها بیان شد و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل- سفاروز استخراج و تخلیص گردیدند [۱۱]. بلافاصله پس از تخلیص، فعالیت آنزیم‌ها سنجش گردید. همچنین صحت خلوص پروتئین توسط SDS-PAGE تأیید گردید.

تعیین فعالیت مخصوص آنزیم

فعالیت آنزیم به‌وسیله دستگاه لومینومتر در محیط بافری تریس با pH ۷/۸ در حضور سوبستراهای لوسیفرین و ATP با واحد RLU Sec^{-1} اندازه‌گیری شد. لوسیفرین در حضور آنزیم به اکسی‌لوسیفرین پرنانرژی تبدیل شده که این ماده پس از برگشت به حالت پایه و تبدیل به اکسی‌لوسیفرین کم انرژی، اختلاف انرژی را به صورت نور مرئی آزاد می‌کند که قابل اندازه‌گیری است. پس از سنجش فعالیت و تعیین غلظت نمونه خالص آنزیم، فعالیت مخصوص آن به‌وسیله تقسیم فعالیت آنزیم بر غلظت آن با واحد $\text{mg}^{-1} \text{RLU Sec}^{-1}$ محاسبه شد.

مطالعات ساختاری

مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی^۱

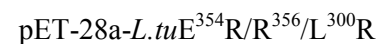
برای تعیین تغییرات ساختار دوم آنزیم در ناحیه Far-UV با استفاده از آنزیم‌های خالص و دیالیز شده با غلظت ۲ mg/ml در دمای ۲۵ درجه و pH ۷/۸ به‌وسیله دستگاه اسپکتروپلاریمتر انجام شد. آنالیز و پردازش طیف‌ها توسط نرم‌افزار اختصاصی J715 که با استفاده از روش فوریه ترانس‌فورم آشفتگی‌های موجود در طیف را با کمترین تغییر شکل در پیک حذف می‌نماید انجام گردید. نتایج به‌صورت بیضی‌واری مولی^۲ $[\theta] \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ و بر اساس میانگین وزن اسیدهای آمینه^۳ MRW محاسبه شد. بیضی‌واری مولی از فرمول $[\theta] = (\theta \times 100 \text{ MRW}) / \text{CL}$ به‌دست می‌آید که C غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، L طول مسیر برحسب سانتی‌متر در کووت حاوی نمونه و θ پارامتر بیضی‌واری اندازه‌گیری شده برحسب درجه در طول موج (λ) می‌باشد. درصد ساختارهای دوم در هر پروتئین با استفاده از نرم افزار مخصوص estimation ساختارهای دوم که از روی طیف‌های CD هر پروتئین محاسبه می‌شود، تعیین گردید.

مطالعات فلورسانس ذاتی:

کیت استخراج پلاسمید و PCR، IPTG و کانامایسین از شرکت مرک و سیگما تهیه شد، دستگاه‌های UV- Luminometer، LS 55 Fluorescence، Visible Spectrophotometer Spectrometer از شرکت PerkinElmer و ترموسایکلر مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر

در این مرحله، از ژن لوسیفرز کلون شده LRR که به وسیله مرتضوی و همکاران [۱۱] ساخته شده بود، به‌صورت



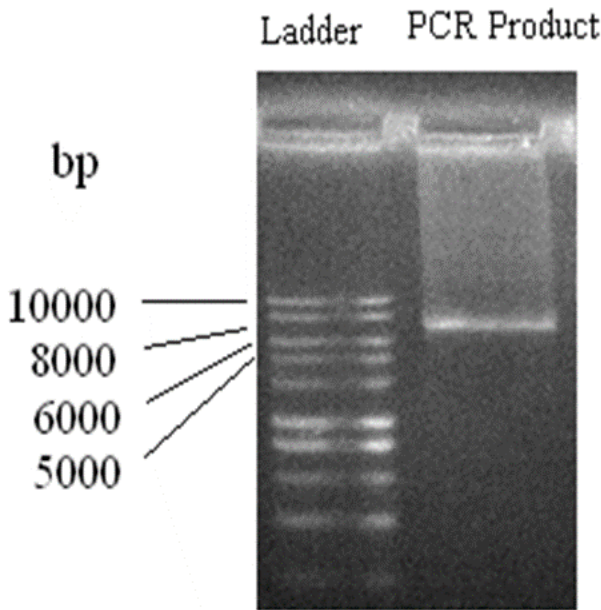
به‌عنوان الگو استفاده شد. طراحی پرایمر با کمک نرم‌افزار Gene-Runner انجام شد. توالی پرایمر Forward جهت وارد کردن جهش $E^{270}A$ عبارت است از:



نوکلئوتیدهای که به‌صورت پررنگ و خط زیر مشخص شده، برای ایجاد جهش گلوتامات به آلانین در نظر گرفته شد.

جهش‌زایی به روش Quick-Change PCR

با استفاده از آنزیم PrimeSTAR HS DNA polymerase، پرایمرهای پیشرو و معکوس، مخلوط dNTPs و وکتور حاوی ژن الگو، جهش‌زایی انجام شد. جهت اطمینان از انجام جهش‌زایی محصول PCR به‌دست‌آمده بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. سپس محصول موردنظر با آنزیم محدودکننده DpnI به منظور حذف پلاسمیدهای مادری و بدون جهش، تیمار شده و پس از آن به سلول‌های مستعد تکثیر $DH5\alpha$ منتقل شد. سلول‌های $DH5\alpha$ بر روی محیط کشت جامد LB آگار کشت داده شدند. پس از رشد کلنی‌ها بر روی پلیت، سه کلنی انتخاب گردیده و از آن‌ها کشت مایع در محیط LB تهیه گردید. پلاسمید باکتری‌های کشت‌شده به روش minipreparation تخلیص گردید. جهت تأیید اعمال جهش‌های موردنظر، پلاسمیدها با استفاده از روش تعیین توالی خودکار (شرکت ماکروژن) به‌وسیله پرایمرهای عمومی، promoter، T7 terminator T7 تعیین توالی شدند. پس از تأیید صحت جهش اعمال‌شده، پلاسمید نو ترکیب حاوی جهش $E^{270}A$ به سلول‌های مستعد بیانی BL21 منتقل و توسط IPTG القا گردید. پروتئین نو ترکیب جدید تحت شرایط مناسب بیان (کشت سلول‌های BL21 حاوی پلاسمید جهش‌یافته ۲۷۰ در محیط XYT2،

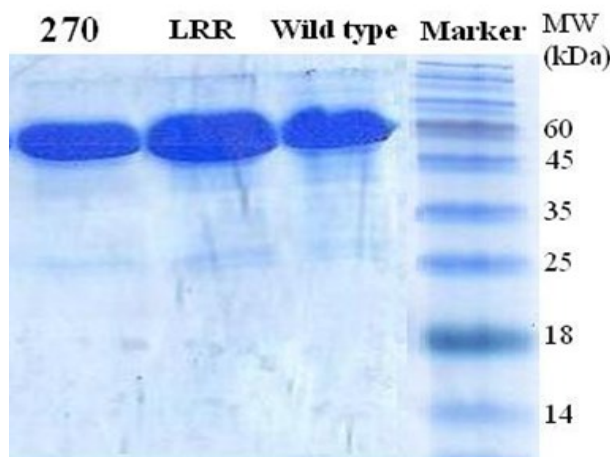


شکل ۱: ژل آگاروز محصول PCR آنزیم جهش یافته ۲۷۰.

طبیعی^۱ و نمونه جهش یافته LRR بر روی ژل SDS-PAGE مقایسه گردید (شکل ۲).

تعیین فعالیت مخصوص آنزیم جهش یافته

نتایج سنجش فعالیت آنزیمها، نشان داد که فعالیت مخصوص آنزیم جهش یافته ۲۷۰ نسبت به جهش یافته LRR در حدود ۴/۲ برابر افزایش یافته است، که این فعالیت ۱۵ درصد فعالیت آنزیم طبیعی است (جدول ۱).



شکل ۲: ژل SDS-PAGE لوسیفرازهای نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های LRR و جهش یافته ۲۷۰. هر ستون یک باند را نشان می‌دهد که دارای وزن یکسان در ناحیه حدود ۶۰ کیلو دالتون که ناحیه لوسیفراز ایرانی طبیعی است قرار گرفته‌اند.

در آنزیم لوسیفراز تنها یک تریپتوفان در موقعیت ۴۱۷ وجود دارد و در یک ناحیه تقریباً سطحی در پروتئین قرار گرفته است. جهت بررسی ساختاری در پروتئین‌ها از برانگیختگی تریپتوفان و نشر فلورسانس حاصل از برانگیختگی استفاده می‌شود. میزان نشر فلورسانس بیانگر تغییر موقعیت فضایی این تریپتوفان در لوسیفراز است. فلورسانس ذاتی با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر PerkinElmer (LS55) با استفاده از آنزیم‌های خالص و دیالیز شده با غلظت ۰/۲ mg/ml انجام شد. طول موج برانگیختگی nm ۲۹۵ مربوط به اسید آمینه تریپتوفان و طول موج نشری در محدوده ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت شد. پس از آن شدت نسبی فلورسانس هر یک از آنزیم‌ها نسبت به آنزیم طبیعی به عنوان آنزیم کنترل محاسبه گردید.

رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت ATP

برای رسم منحنی استاندارد، میزان نشر لومینسانسی آنزیم لوسیفراز در حضور غلظت‌های صفر تا ۰/۵ میلی‌مولار ATP و غلظت ثابت یک میلی‌مولار لوسیفراز در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۰/۵ میلی‌مولار منیزیم با pH ۷/۸ ثبت شد. با داشتن منحنی استاندارد می‌توان غلظت ATP را در هر نمونه از جمله سوپ باکتری به دست آورد.

یافته‌ها

تهیه پلاسمید حامل ژن آنزیم جهش یافته

جهت استخراج پلاسمید حامل ژن آنزیم جهش یافته، ابتدا پلاسمید حاوی ژن LRR با حدود ۷۰۰۰ جفت باز به عنوان ژن الگو، با روش miniprep preparation تخلیص گردید. در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس طراحی شده، جهش هدف دار E²⁷⁰A به وسیله روش PCR به دست آمد و محصول، جهت تأیید بر روی ژل الکتروفورز آگاروز آشکار گردید (شکل ۱).

جهت تکثیر، محصول PCR به سلول‌های تکثیری DH5α انتقال داده شد و جهش مورد نظر در پلاسمید با کمک روش تعیین توالی تأیید شد. سپس پلاسمید حاوی ژن جهش یافته، به سلول‌های بیانی BL21 انتقال داده شد. پس از شکستن سلول‌های باکتری، پروتئین مورد نظر که در سوپ سلولی بود به کمک ستون تمایلی نیکل-سفاروز خالص گردید و صحت خلوص آن با حضور آنزیم نمونه‌های

جدول ۱: فعالیت مخصوص آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته.

| آنزیم | فعالیت مخصوص (RLU Sec ⁻¹ mg ⁻¹) |
|-------|--|
| طبیعی | $1/2 \times 10^{13}$ |
| LRR | $0/7 \times 10^9$ |
| ۲۷۰ | $0/3 \times 10^{10}$ |

سینتیک آنزیم‌های جهش‌یافته

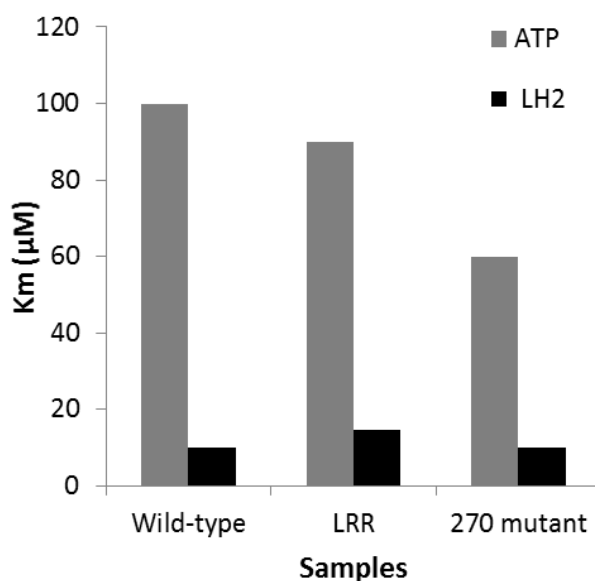
تأثیر جهش‌ها بر K_m لوسیفراز و ATP لوسیفرازهای طبیعی و جهش‌یافته

همان‌طور که اطلاعات سینتیکی به دست آمده نشان می‌دهند K_m آنزیم جهش‌یافته ۲۷۰ برای لوسیفراز و ATP، در مقایسه با آنزیم LRR کاهش یافته است که این نشان‌دهنده افزایش تمایل جهش‌یافته ۲۷۰ نسبت به دو سوبسترای فوق می‌باشد که تأیید کننده فعالیت بیشتر آنزیم ۲۷۰ نسبت به LRR است (شکل ۳).

بررسی‌های ساختاری

درصد ساختارهای دوم در پروتئین‌ها

همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، پروتئین طبیعی حاوی ۴۳/۳ درصد آلفاهلیکس، ۴۰/۱ درصد صفحات بتا و ۱۶/۸ درصد پیچ بتا (β -Turn) می‌باشد و با جهش‌های اعمال شده در پروتئین LRR درصد ساختار آلفاهلیکس افزایش چشمگیری یافته است. در پروتئین ۲۷۰ نسبت به جهش‌یافته LRR از درصد ساختارهای آلفا



شکل ۳: مقادیر K_m برای ATP و لوسیفراز در آنزیم‌های جهش‌یافته.

جدول ۲: درصد ساختارهای دوم در پروتئین‌های نمونه‌های طبیعی و جهش‌یافته.

| Enzyme | α - Helix | β - Sheet | β - Turn |
|-----------|------------------|-----------------|----------------|
| Wild-type | ۴۳/۳ | ۴۱/۱ | ۱۶/۸ |
| LRR | ۶۲/۰ | ۳۳/۲ | ۴/۸ |
| ۲۷۰ | ۴۱/۱ | ۴۲/۹ | ۱۶/۰ |

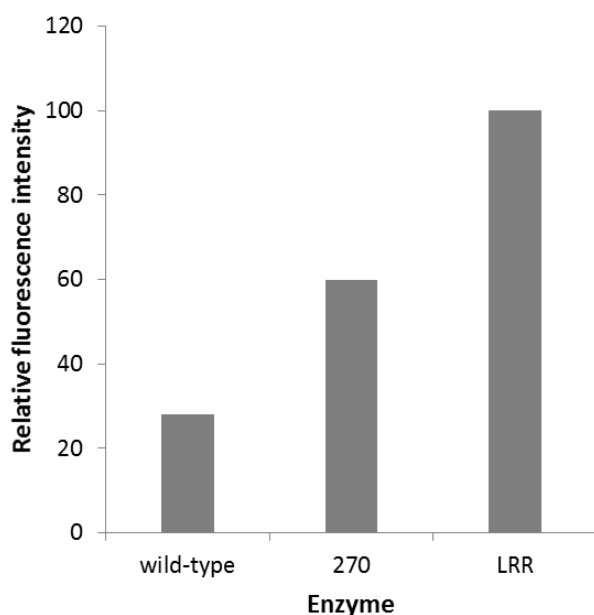
کاسته شده است.

مطالعات فلورسانس ذاتی

بررسی‌های طیف فلورسانس نمونه‌ها نشان داد که اگر شدت فلورسانس آنزیم LRR را عدد ۱۰۰ در نظر بگیریم، شدت نشر آنزیم طبیعی، ۲۹ درصد و آنزیم ۲۷۰، ۵۴ درصد را نشان می‌دهد (شکل ۴).

تعیین رابطه بین غلظت ATP و نشر بیولومینسانس

در حضور غلظت ثابت لوسیفراز و غلظت‌های متغیر ATP منحنی استاندارد در طول موج ۵۵۰ نانومتر ترسیم گردید. همان‌طور که در

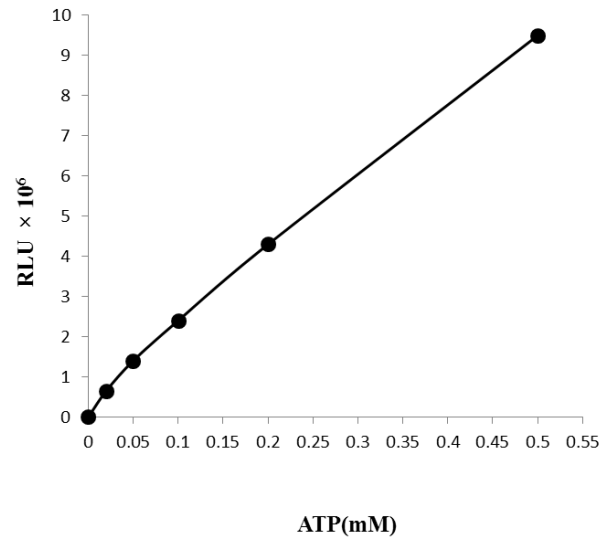


شکل ۴: شدت نسبی فلورسانس ذاتی آنزیم‌های نمونه‌های طبیعی و جهش‌یافته. نمونه طبیعی دارای شدت نشر کمتری نسبت به جهش‌یافته LRR و ۲۷۰ است. نمونه LRR دارای بیشترین نشر فلورسانس است که نشان‌دهنده فشردگی در ساختار پروتئین است. جایگزینی اسید آمینه آلانین با گلوتامات در جهش‌یافته ۲۷۰ از شدت نشر نسبت به LRR کاسته است که نشان‌دهنده بازتر شدن ساختمان آنزیم است.

کاهش انعطاف در ساختار آنزیم شده که این سختی ساختار، به نوبه خود به دلیل نزدیکی محل جهش به مرکز فعال، بر این مرکز نیز اثر گذاشته و فعالیت آنزیم را بسیار کاهش داده است [۱۱]. به منظور ارزیابی امکان فعال سازی آنزیم LRR، تحقیق حاضر بر اساس جهشی که گلو تامات ۲۷۰ را در آنزیم نامبرده به آلانین تبدیل کند طراحی گردید. آمینو اسید آلانین به این دلیل انتخاب گردید که دارای زنجیره جانبی هیدروفوب کوتاه است و ممانعت فضایی را به حداقل می‌رساند. پروتئین جدید به نام پروتئین ۲۷۰ تهیه گردید تا با بررسی سینتیکی و ساختاری آن بتوان فعال سازی مجدد آن را بررسی نمود.

شکل ۱ نشان دهنده تکثیر ژن لوسیفراز جهش یافته ۲۷۰ در ناحیه حدود ۷۰۰۰ جفت باز می‌باشد که ناحیه مربوط به لوسیفراز می‌باشد. به منظور تعیین فعالیت مخصوص آنزیم‌ها بایستی از نمونه‌های دارای فعالیت و یا خلوص بالا استفاده نمود که شکل ۲ نشان دهنده بیان مناسب و خلوص بالای آنزیم‌های طبیعی و جهش یافته به دست آمده می‌باشد. همان طور که جدول ۱ نشان می‌دهد فعالیت مخصوص آنزیم ۲۷۰ اندکی بیشتر از آنزیم LRR می‌باشد. اطلاعات سینتیکی به دست آمده در شکل ۳ نشان داد Km های آنزیم ۲۷۰ برای ATP و لوسیفراز کمتر از آنزیم LRR می‌باشند، این یافته‌ها می‌توانند توجیه کننده افزایش فعالیت ۲۷۰ نسبت به LRR باشند. مشاهده درصد ساختارهای دوم در جدول ۲ نشان داد، با اعمال جهش $E^{270}A$ در پروتئین LRR درصد ساختارهای آلفا کاهش یافته است. بر اساس تحقیقات گزارش شده تغییرات در ساختار دوم پروتئین منجر به تغییرات در ساختار سه بعدی آن خواهد شد [۱۶]. در نتیجه می‌توان پیش بینی کرد این تغییرات در ساختار دوم پروتئین ۲۷۰ به نوعی سبب درهم ریختگی ساختار سوم آن شده است، به طوری که از تراکم و فشردگی ساختار آن کاسته شده است.

با استفاده از طیف‌های فلورسانس ذاتی می‌توان تغییرات ساختار سوم و میزان فشردگی پروتئین‌ها را بررسی نمود. در آنزیم لوسیفراز تنها یک تریپتوفان در موقعیت ۴۱۷ وجود دارد که نزدیک سطح پروتئین بوده و هرگونه تغییر در هیدروفوبیسیته اطراف آن سبب تغییر در طیف فلورسانس ذاتی آنزیم می‌شود [۱۷]. همان طور که شکل ۴ نشان می‌دهد بیشترین شدت فلورسانس مربوط به آنزیم LRR، کمترین شدت مربوط به آنزیم طبیعی است و جهش یافته ۲۷۰ بین



شکل ۵: منحنی استاندارد تعیین غلظت ATP.

شکل ۵ مشخص می‌باشد با افزایش غلظت ATP از صفر تا ۰/۵ میلی‌مولار، نشر بیولومینسانس به طور خطی افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری

بیولومینسانس یا تولید نور در سیستم‌های زیستی پدیده‌ای است که توسط آنزیم لوسیفراز کاتالیز می‌شود. علیرغم کاربردهای زیاد واکنش تولید نور در علوم زیستی، به دلیل ناپایدار بودن آنزیم فوق در برابر حرارت، استفاده از آن خصوصاً در *in vivo* با محدودیت همراه می‌باشد. بررسی آنزیم‌های ترموفیل نشان داده است که برخی از اسید آمینه‌ها به ویژه آرژنین در لوپ‌های سطحی آن‌ها بیشتر دیده می‌شود. حضور آرژنین در این مناطق سبب برقراری پل‌های نمکی بین آرژنین و آمینو اسیدهای دیگر مانند اسید گلو تامیک می‌گردد که این پیوندها سبب استحکام ساختاری پروتئین و پایداری بیشتر آن نسبت به حرارت می‌گردد [۱۳ و ۱۲]. در مطالعات پس از کلون و سنتز پروتئین لوسیفراز گونه *L.turkestanicus*، جهش‌های مختلفی بر روی این آنزیم اعمال شد و پروتئین‌هایی با خواص جدید و بهبود یافته به دست آمد [۱۵ و ۱۴]. یکی از این جهش‌یافته‌ها $(E^{354}RR^{356}L^{300}R)$ LRR بود که اگرچه از لحاظ حرارتی از نمونه طبیعی پایدارتر بود ولی فعالیت آن به ۰/۰۲ درصد آنزیم طبیعی رسیده بود و یک آنزیم تقریباً غیرفعال تلقی شد [۱۱]. با بررسی نرم افزار شبیه ساز نمونه LRR پیشنهاد شد که با تبدیل لوسین ۳۰۰ به آرژنین، بین این اسید آمینه و گلو تامات ۲۷۰ پیوند الکتروستاتیک یا یونی برقرار شده است. وجود این پیوند جدید سبب

- cence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 295-303.
6. Trezzani I, Nadri M, Dorel C, Lejeune P, Bellalou J, Lieto J, et al. Monitoring of recombinant protein production using bioluminescence in a semiautomated fermentation process. *Biotechnol Prog* 2003; 19: 1377-82.
 7. O'Connell-Rodwell CE, Burns SM, Bachmann MH, Contag CH. Bioluminescent indicators for in vivo measurements of gene expression. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 19-23.
 8. Ueda I, Shinoda F, Kamaya H. Temperature-dependent effects of high pressure on the bioluminescence of firefly luciferase. *Biophys J* 1994; 66: 2107-10.
 9. Govardhan CP. Cross linking of enzymes for improved stability and performance. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 331-5.
 10. Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids* 2008; 34: 25-33.
 11. Mortazavi M, Hosseinkhani S. Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops. *Protein Eng Des Sel* 2011; 24: 893-903.
 12. Xiao L, Honig B. Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins. *J Mol Biol* 1999; 289: 1435-44.
 13. Chan CH, Tez H, Wong KB. Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding. *PLoS One* 2011; 6: 1-8.
 14. Tafreshi NK, Hosseinkhani S, Sadeghizadeh M, Sadeghi M, Ranjbar B, Naderi-Manesh H. The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. *J Biol Chem* 2007; 282: 8641-7.
 15. Alipour BS, Hosseinkhani S, Ardestani SK, Moradi A. The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase. *Photochem Photobiol Sci* 2009; 8: 847-55.
 16. Greenfield NJ. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* 1996; 235: 1-10.
 17. Natalia N, Ugarova NN. Interaction of firefly luciferase with substrates and their analogs: a study using fluorescence spectroscopy methods. *Photochem Photobiol Sci* 2008; 7: 218-22.

این دو قرار گرفته است. این یافته‌ها نشان می‌دهند در جهش‌یافته ۲۷۰ از هیدروفوبیسیته محیط اطراف تریپتوفان کاسته شده است و این بیان‌کننده بازتر شدن ساختار جهش‌یافته ۲۷۰ نسبت به LRR می‌باشد. به عبارت دیگر این جهش سبب شده است ساختار سه‌بعدی آنزیم ۲۷۰ به گونه‌ای تغییر کند که تریپتوفان به سمت محیط هیدروفیل تر تغییر موقعیت دهد. طبق تحقیقات و گزارش‌های داده شده وجود پل‌های نمکی خصوصاً در سطح یک پروتئین سبب افزایش استحکام ساختار آن می‌گردد [۱۳ و ۱۲]، در نتیجه می‌توان پیش‌بینی نمود بازتر شدن ساختار سه‌بعدی جهش‌یافته ۲۷۰، ساختار سوم آنزیم را به گونه‌ای تغییر داده است که فعالیت آن کمی بیش از آنزیم LRR گردد. همان‌طور که شکل ۵ نشان می‌دهد از آنزیم ۲۷۰ می‌توان در تعیین غلظت ATP در محیط‌های مختلف سود جست، و با افزودن سوبسترای لوسیفرین و آنزیم لوسیفرز به یک نمونه آزمایشگاهی مانند عصاره باکتری یا نمونه‌های بالینی حضور و مقدار ATP موجود در آن محلول را اندازه‌گیری نمود.

در نتیجه پیشنهاد می‌شود، با توجه به آنکه نشر نور توسط آنزیم ۲۷۰ در نمونه‌های آزمایشگاهی به راحتی قابل اندازه‌گیری است، این آنزیم می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب جهت سنجش ATP در سوپ‌های آلوده میکروبی و نمونه‌های بالینی مانند خون و مایعات بدن مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Deluca M, McElroy WD. Purification and properties of firefly luciferase. *Method Enzymol* 1978; 57: 3-15.
2. Ford SR, Chenault KH, Bunton LS, Hampton GJ, McCarthy J, Hall MS, et al. Use of firefly luciferase for ATP measurement: other nucleotides enhance turnover. *J Biolumin Chemilumin* 1996; 11: 149-67.
3. Spielmann H, Jacob-Muller U, Schulz P. Simple assay of 0.1-1.0 pmol of ATP, ADP, and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase. *Anal Biochem* 1981; 113: 172-8.
4. Kricka LJ. Strategies for immunoassay. *Pure & Appl Chem* 1996; 68: 1825-30.
5. Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Michelini E, Guardigli M. Biotechnological applications of biolumines-