Journal of Police Medicine

Spring 2015; Vol. 4, No. 1: 9-16

Original Article

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

Zahra Sobhani Damavandifar[1]
Saman Hosseinkhani[2*]
Reza Hassan Sajedi[3]

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

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

[3]Associate 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

ABSTRACT

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 $E^{354}RR^{356}$ 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

بهار ۱۳۹۴– دوره ۴ – شماره ۱– صفحات ۱۶-۹

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

تولید آنزیم لوسیفراز ایرانی جهش‌یافته به روش SDM با کاربرد تشخیص بالینی

تاریخ دریافت: ۱۲ دی ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۱۴ اردیبهشت ۱۳۹۴ **تاریخ پذیرش:** ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: آنزیمی که واکنش بیولومینسانس یا نشر نور را در تعدادی از موجودات کاتالیز می‌کند لوسیفراز نام دارد. از واکنش کاتالیز شده توسط این آنزیم می‌توان در بسیاری از سنجش‌های تشخیص طبی ازجمله سنجش مقدار ATP در محیط، کیت‌های 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 جهش‌زایی هدف‌دار، لوسیفراز های نوترکیب مختلفی ساخته‌شده‌اند. یکی از این آنزیم‌ها با جهش $L^{300}R$ بر جهش‌یافته ERR ($E^{354}RR^{356}$) لوسیفراز ایرانی L.turkestanicus به‌دست آمد که جهش‌یافته LRR ($ERR/L^{300}R$) نام‌گذاری شد. این آنزیم اگرچه نسبت به آنزیم طبیعی به حرارت مقاوم‌تر بود، اما تقریباً غیرفعال بود. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی امکان فعال‌سازی مجدد آنزیم غیرفعال شده LRR با کمک روش جهش‌زایی هدف‌دار جهت استفاده از آنزیم‌های جهش‌یافته در ساخت کیت‌های سنجش ATP و دیگر آزمایش‌های زیستی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق با روش جهش‌زایی هدف‌دار اسیدآمینه گلوتامات ۲۷۰ در آنزیم LRR به آلانین تبدیل شد. سپس مطالعات سینتیکی آنزیم انجام شد و خصوصیات ساختاری جهش‌یافته فوق نیز به‌وسیله تکنیک‌های فلورسنت و CD بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج بررسی‌های سینتیکی نشان داد که آنزیم جهش‌یافته ۲۷۰ فعال‌تر از LRR می باشد. همچنین مطالعات ساختاری نشان داد که آنزیم فوق هم از لحاظ ساختارهای دوم و هم ساختار سوم پروتئین، تغییرات عمده‌ای نموده است.

نتیجه‌گیری: با جهشی که در جهش‌یافته ۲۷۰ اعمال و سبب فعال‌تر شدن نسبی آن در مقایسه با LRR شد، پیشنهاد می‌شود بتوان از آنزیم ۲۷۰ در ساخت کیت‌های سنجش بالینی استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: لوسیفراز، جهش‌زایی نقطه‌ای (SDM)، فعالیت آنزیمی، ساختار سه‌بعدی

زهرا سبحانی دماوندی فر[۱]

سامان حسینخانی[۲*]

رضا حسن ساجدی[۳]

[۱]دانشجوی دکترای، بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲]استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

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

[*]نویسنده مسئول:

سامان حسینخانی

تلفن: ۲۱۸۲۸۸۴۴۰۷(۹۸+)

پست الکترونیک:

saman_h@modares.ac.ir

مقدمه

بیولومینسانس پدیده ایست که طی آن در تعدادی از موجودات زنده شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ماهی‌ها و حشرات نشر نور رخ می دهد. آنزیم مؤثر در این پدیده لوسیفراز است که لوسیفرین را در حضور ATP و Mg^{2+} به اکسی لوسیفرین پرانرژی تبدیل می‌کند و این ماده انرژی خود را به شکل نور مرئی ساطع کرده، به حالت پایه می‌رسد. به‌عبارت‌دیگر در این فرایند انرژی شیمیایی به انرژی نورانی تبدیل می‌شود [۱]. واکنش کاتالیز شده توسط لوسیفراز، کاربردهای گسترده‌ای در علوم مختلف زیست‌شناسی دارد.

Journal of Police Medicine
Spring 2015; Vol. 4, No. 1: 9-16

یکی از مهم‌ترین کاربردهای لوسیفراز، تعیین مقدار ATP در یک محیط به‌عنوان شاخصی از مقدار آلودگی میکروبی و تعداد سلول‌های زنده در یک محیط می‌باشد. به‌عنوان‌مثال 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 تست های 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 ساخته‌شده، پلیت با یکی از آنتی‌بادی‌ها پوشیده می‌شود و سپس آنتی‌ژن به آن اضافه می‌گردد. پس‌ازآن آنتی‌بادی نشان‌دار شده با بیوتین به آن اضافه و در آخر با افزودن پروتئین ادغامی استرپتوآویدین – لوسیفراز به خانه‌ها، مقدار آنتی‌ژن در نمونه توسط لومینومتر سنجش می‌شود. در این سنجش شدت نور با غلظت آنتی‌ژن متناسب است. این روش برای سنجش مقدار آنتی‌ژن های ویروسی و مارکرهای توموری مناسب است.

در تست‌های ELISA رقابتی، آنتی‌ژن موردنظر با آنتی‌ژن متصل شده با بیوتین برای اتصال به آنتی‌بادی پوشش داده‌شده در کف پلیت رقابت می‌کنند. هر چه غلظت آنتی‌ژن در نمونه بیشتر باشد مقدار کمتری آنتی‌ژن بیوتینه به آنتی‌بادی متصل می‌شود. سپس غلظت آنتی‌ژن متصل به بیوتین با افزودن کونژوگه استرپتوآویدین – لوسیفراز با لومینومتری تعیین می‌شود. این روش برای سنجش غلظت‌های زیاد آنتی‌ژن‌های 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 میان‌کنش های پروتئین‌ها با یکدیگر در سلول‌های زنده دارد. در این فرایند اگر دو پروتئین موردنظر که هرکدام 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 یافته و منجر به نشر نور قابل‌ردیابی 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 مدل‌سازی بیماری‌های انسانی استفاده نمود [۸ و ۷].

در راستای فعال‌سازی مجدد این جهش‌یافته و با هدف استفاده از آنزیم فوق در سنجش ATP، با استفاده از روش جهش زایی هدف‌دار[1] 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 زنجیره‌ای‌است و ۵۴۷ آمینواسید دارد، به‌وسیله تکنیک جهش زایی هدف دار، نمونه جهش‌یافته LRR ($E^{354}RR^{356}L^{300}R$) به‌دست آمد [۱۱] که اگرچه این آنزیم نسبت به آنزیم طبیعی به حرارت مقاوم‌تر شده بود اما فعالیت آن به ۰/۰۲ درصد آنزیم طبیعی رسیده بود. پیشنهاد گردید پیوند یونی تشکیل‌شده 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 انعطاف‌پذیری جایگاه فعال نیز کاسته شده و فعالیت آنزیم به حداقل رسیده است [۱۱]. این تحقیق، در جهت ارزیابی فعال‌سازی آنزیم LRR غیرفعال با روش جهش‌زایی هدف‌دار 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 ایجادشده توسط آن در محل قرارگیری‌اش حداقل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

[1]: Site-directed Mutagenesis

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۱- صفحات ۱۶-۹

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

طراحی پرایمر

در این مرحله، از ژن لوسیفراز کلون شده LRR که به وسیله مرتضوی و همکاران [۱۱] ساخته‌شده بود، به‌صورت pET-28a-*L.tu*$E^{354}R/R^{356}/L^{300}R$ به‌عنوان الگو استفاده شد. طراحی پرایمر با کمک نرم‌افزار Gene-Runner انجام شد. توالی پرایمر Forward جهت واردکردن جهش $E^{270}A$ عبارت است از:

5'-TTATGTATAGATGTGAA**GCG**GAATTATTTTTAC GATCAC 3'

نوکلئوتیدهای که به‌صورت پررنگ و خط زیر مشخص‌شده، 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 جهش زایی 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 پس‌ازآن به سلول‌های مستعد تکثیری DH5α منتقل شد. سلول‌های DH5α 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 نوترکیب حاوی جهش $E^{270}A$ به سلول‌های مستعد بیانی BL21 منتقل و توسط IPTG القا گردید. پروتئین نوترکیب جدید تحت شرایط مناسب بیان (کشت سلول‌های BL21 حاوی پلاسمید جهش‌یافته ۲۷۰ در محیط XYT2، 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 آنزیم ها سنجش گردید. همچنین صحت خلوص پروتئین توسط SDS-PAGE تائید 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 پرانرژی تبدیل شده که این ماده پس از برگشت به حالت پایه و تبدیل به اکسی لوسیفرین کم انرژی، اختلاف انرژی را به‌صورت نور مرئی آزاد می‌کند که قابل‌اندازه‌گیری است. پس از سنجش فعالیت و تعیین غلظت نمونه خالص آنزیم، فعالیت مخصوص آن به‌وسیله تقسیم فعالیت آنزیم بر غلظت آن با واحد RLU Sec^{-1} mg^{-1} محاسبه شد.

مطالعات ساختاری

مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی[1]

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[2] [θ] deg cm^2 $dmol^{-1}$ و بر اساس میانگین وزن اسیدهای آمینه[3] MRW محاسبه شد. بیضی واری مولی از فرمول $[\theta] = (\theta \times 100\ MRW) / CL$ به‌دست می‌آید که C غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، L طول مسیر برحسب سانتی‌متر در کووت حاوی نمونه و θ پارامتر بیضی واری اندازه‌گیری شده برحسب درجه در طول‌موج (λ) می‌باشد. درصد ساختارهای دوم در هر پروتئین با استفاده از نرم افزار مخصوص stimation ساختارهای دوم که از روی طیف‌های CD هر پروتئین محاسبه می‌شود، تعیین گردید.

مطالعات فلورسانس ذاتی:

1: CD Circular Dichroism, 2: molar ellipticity, 3: MeanResidueWeight

Journal of Police Medicine
Spring 2015; Vol. 4, No. 1: 9-16

در آنزیم لوسیفراز تنها یک تریپتوفان در موقعیت ۴۱۷ وجود دارد و در یک ناحیه تقریباً سطحی در پروتئین قرارگرفته 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 ۰/۰۲ mg/ml انجام شد. طول‌موج برانگیختگی nm ۲۹۵ مربوط به اسیدآمینه تریپتوفان و طول‌موج نشری در محدوده ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت شد. پس‌ازآن شدت نسبی فلورسانس هر یک از آنزیم‌ها نسبت به آنزیم طبیعی به‌عنوان آنزیم کنترل محاسبه گردید.

رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت ATP

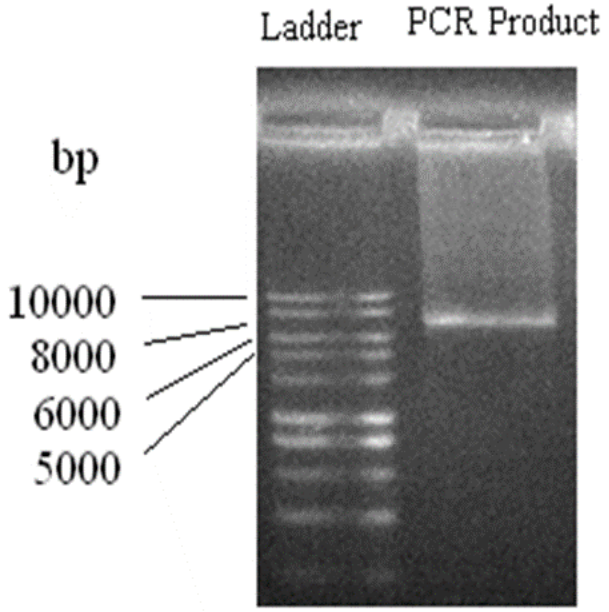
برای رسم منحنی استاندارد، میزان نشر لومینسانسی آنزیم لوسیفراز در حضور غلظت‌های صفر تا ۰/۵میلی‌مولار ATP و غلظت ثابت یک میلی‌مولار لوسیفرین در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۰/۵ میلی‌مولار منیزیم با pH ۷/۸ ثبت شد. با داشتن منحنی استاندارد می‌توان غلظت ATP را در هر نمونه ازجمله سوپ باکتری به‌دست آورد.

یافته‌ها

تهیه پلاسمید حامل ژن آنزیم جهش‌یافته

جهت استخراج پلاسمید حامل ژن آنزیم جهش‌یافته، ابتدا پلاسمید حاوی ژن LRR با حدود ۷۰۰۰ جفت باز به‌عنوان ژن الگو، با روش minipreparation تخلیص گردید. در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس طراحی‌شده، جهش هدف دار $E^{270}A$ به‌وسیله روش PCR به‌دست آمد و محصول، جهت تائید بر روی ژل الکتروفورز آگاروز آشکار گردید (شکل ۱).

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

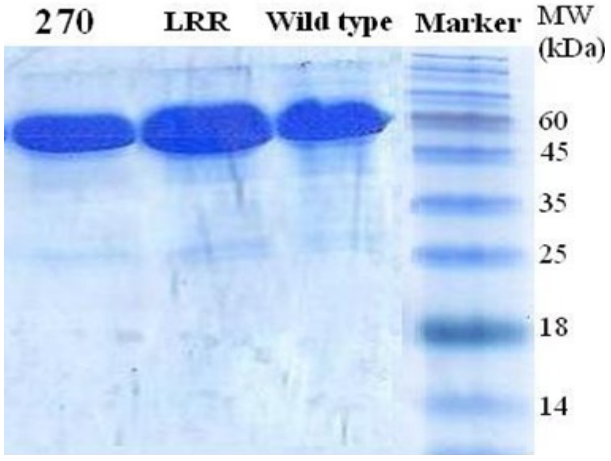


شکل ۱: ژل آگاروز محصول PCR آنزیم جهش‌یافته ۲۷۰.

طبیعی[1] و نمونه جهش‌یافته LRR بر روی ژل SDS-PAGE مقایسه گردید (شکل ۲).

تعیین فعالیت مخصوص آنزیم جهش‌یافته

نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌ها، نشان داد که فعالیت مخصوص آنزیم جهش‌یافته ۲۷۰ نسبت به جهش‌یافته 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 جهش‌یافته ۲۷۰. هر ستون یک باند را نشان می‌دهد که دارای وزن یکسان در ناحیه حدود ۶۰ کیلودالتون که ناحیه لوسیفراز ایرانی طبیعی است قرارگرفته‌اند.

1: wild-type

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۱- صفحات ۱۶-۹

جدول ۱: فعالیت مخصوص آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته.

آنزیم	فعالیت مخصوص ($RLU\ Sec^{-1}\ mg^{-1}$)
طبیعی	$۱/۲\times۱۰^{۱۳}$
LRR	$۰/۷\times۱۰^{۹}$
۲۷۰	$۰/۳\times۱۰^{۱۰}$

سینتیک آنزیم‌های جهش‌یافته

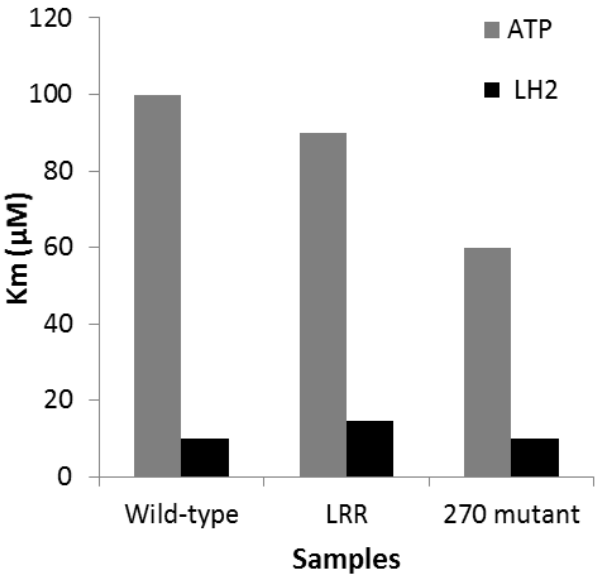
تأثیر جهش‌ها بر K_m لوسیفرین و ATP لوسیفرازهای طبیعی و جهش‌یافته

همان‌طور که اطلاعات سینتیکی به‌دست‌آمده نشان می‌دهند K_m آنزیم جهش‌یافته ۲۷۰ برای لوسیفرین و ATP، در مقایسه با آنزیم LRR کاهش یافته است که این نشان‌دهنده افزایش تمایل جهش‌یافته ۲۷۰ نسبت به دو سوبسترای فوق می‌باشد که تائید 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 اعمال‌شده در پروتئین LRR درصد ساختار آلفاهلیکس افزایش چشمگیری یافته است. در پروتئین ۲۷۰ نسبت به جهش‌یافته LRR از درصد ساختارهای آلفا



شکل ۳: مقادیر Km برای ATP و لوسیفرین در آنزیم‌های جهش‌یافته.

جدول ۲: درصد ساختارهای دوم در پروتئین‌های نمونه‌هاب 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

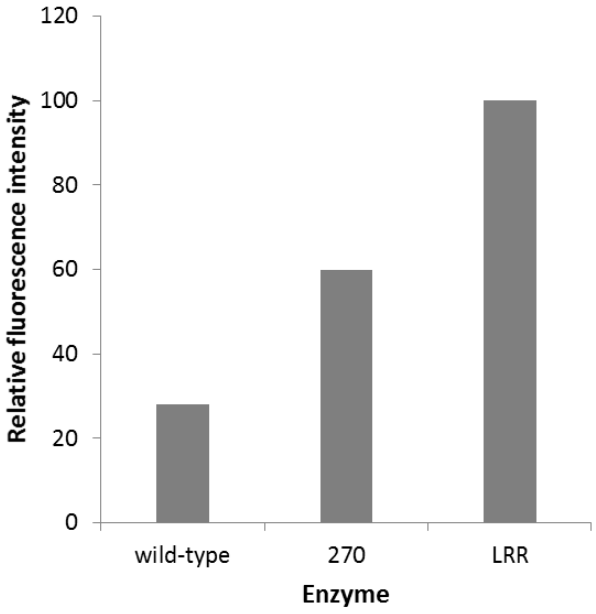
کاسته شده است.

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 می دهد (شکل ۴).

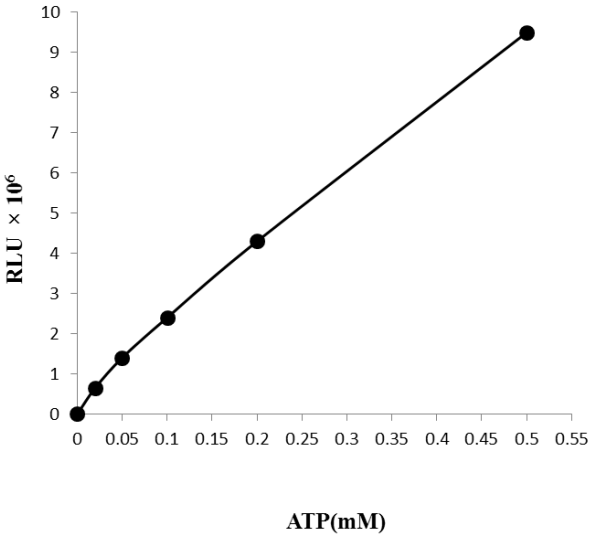
تعیین رابطه بین غلظت ATP و نشر بیولومینسانس

در حضور غلظت ثابت لوسیفرین و غلظت‌های متغیر ATP منحنی استاندارد در طول‌موج 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 اسیدآمینه آلانین با گلوتامات در جهش‌یافته ۲۷۰ از شدت نشر نسبت به LRR کاسته است که نشان‌دهنده بازتر شدن ساختمان آنزیم است.

Journal of Police Medicine
Spring 2015; Vol. 4, No. 1: 9-16



شکل ۵: منحنی استاندارد تعیین غلظت ATP.

شکل ۵ مشخص می‌باشد با افزایش غلظت ATP از صفر تا ۰/۵ میلی‌مولار، نشر بیولومینسانس به‌طور 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، به‌دلیل 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 اسیدآمینه‌ها به‌ویژه آرژنین در لوپ‌های سطحی آن‌ها بیشتر دیده می‌شود. حضور آرژنین در این مناطق سبب برقراری پل های نمکی بین آرژنین و آمینواسیدهای دیگر مانند اسید گلوتامیک 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 بهبودیافته به‌دست آمد [۱۵ و ۱۴]. یکی از این جهش‌یافته‌ها LRR($E^{354}RR^{356}L^{300}R$) بود که اگرچه ازلحاظ 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 نرم‌افزار شبیه‌ساز نمونه LRR پیشنهاد شد که با تبدیل لوسین ۳۰۰ به آرژنین، بین این اسیدآمینه و گلوتامات ۲۷۰ پیوند الکتروستاتیک یا یونی برقرارشده‌است. وجود این پیوند جدید سبب کاهش انعطاف در ساختار آنزیم شده که این سختی ساختار، به نوبه خود به‌دلیل 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 فعال‌سازی آنزیم LRR، تحقیق حاضر بر اساس جهشی که گلوتامات ۲۷۰ را در آنزیم نامبرده به آلانین تبدیل کند طراحی گردید. آمینواسید 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 فعال‌سازی مجدد آن را بررسی نمود.

شکل ۱ نشان‌دهنده تکثیر ژن لوسیفراز جهش‌یافته ۲۷۰ در ناحیه حدود ۷۰۰۰ جفت باز می‌باشد که ناحیه مربوط به لوسیفراز می‌باشد. به‌منظور تعیین فعالیت مخصوص آنزیم‌ها بایستی از نمونه‌های دارای فعالیت و یا خلوص بالا استفاده نمود که شکل ۲ نشان‌دهنده بیان مناسب و خلوص بالای آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته به‌دست‌آمده می‌باشد. همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد فعالیت مخصوص آنزیم ۲۷۰ اندکی بیشتر از آنزیم LRR می‌باشد. اطلاعات سینتیکی به‌دست‌آمده در شکل ۳ نشان داد Km های آنزیم ۲۷۰ برای ATP و لوسیفرین کمتر از آنزیم LRR می‌باشند، این یافته‌ها می‌توانند توجیه‌کننده 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 گزارش‌شده تغییرات در ساختار دوم پروتئین منجر به تغییرات در ساختار سه‌بعدی آن خواهد شد [۱۶]. درنتیجه می‌توان پیش‌بینی کرد این تغییرات در ساختار دوم پروتئین ۲۷۰ به‌نوعی سبب درهم‌ریختگی ساختار سوم آن شده است، به‌طوری‌که 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]. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد بیشترین شدت فلورسانس مربوط به آنزیم LRR، کمترین شدت مربوط به آنزیم طبیعی است و جهش‌یافته ۲۷۰ بین

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۱- صفحات ۱۶-۹

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. به‌عبارت‌دیگر این جهش سبب شده است ساختار سه‌بعدی آنزیم ۲۷۰ به‌گونه‌ای تغییر کند که تریپتوفان به سمت محیط هیدروفیل‌تر تغییر موقعیت دهد. طبق تحقیقات و گزارش های داده‌شده وجود پل‌های نمکی خصوصاً در سطح یک پروتئین سبب افزایش استحکام ساختار آن می‌گردد [۱۳ و ۱۲]، درنتیجه می‌توان پیش‌بینی نمود بازتر شدن ساختار سه‌بعدی جهش‌یافته ۲۷۰، ساختار سوم آنزیم را به‌گونه‌ای 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 لوسیفراز به یک نمونه آزمایشگاهی مانند عصاره باکتری یا نمونه‌های بالینی حضور و مقدار ATP موجود در آن محلول را اندازه‌گیری نمود.

درنتیجه پیشنهاد می‌شود، با توجه به آنکه نشر نور توسط آنزیم ۲۷۰ در نمونه‌های آزمایشگاهی به‌راحتی قابل‌اندازه‌گیری است، این آنزیم می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت سنجش ATP در سوپ‌های آلوده میکروبی و نمونه‌های بالینی مانند خون و مایعات بدن مورداستفاده 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 bioluminescence 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.