



Impact of Mutation at Position 330 of Luciferase on the Structure and Function

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Jarchi S.¹ MSc,
Ataei F.*¹ PhD,
Hosseinkhani S.¹ PhD

How to cite this article

Jarchi S, Ataei F, Hosseinkhani S. Impact of Mutation at Position 330 of Luciferase on the Structure and Function. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 187-192.

ABSTRACT

Luciferase from firefly *Photinus pyralis* (P .py) is a peroxisomal enzyme that converts a heterocyclic substrate luciferin to an excited state oxyluciferin in the presence of Mg²⁺-ATP and O₂. Excited oxyluciferin with the emission of visible light is changed to its ground state. The combination of rapidity, sensitivity, and convenience has led to the development of a broad range of luminescence applications. In spite of wide ranges applications, firefly luciferase is unstable against changes in chemical and physical conditions, thereby reduce its precision and sensitivity. The most undesirable instability of the luciferase is low thermostability and high susceptibility to proteolytic degradation. According to previous studies, limited proteolysis by trypsin of P .py luciferase indicated six cleavage sites on two accessible regions: 206-220 (Including K206, R213, and R218) and 329-341 (Including K329, R330, and R337) on N-terminal domain. In this study, we used site-directed mutagenesis to introduce one point mutation on the 329-341 accessible regions of P. py luciferase, in order to investigate the role of R330 on the enzyme structure and function which R330 changed to Q. Based on limited proteolysis data, R330Q mutant didn't significantly change compared to wild type, but this mutation caused several alterations in enzymatic properties including shifting the pH optimum from 7.5 to 8 and increasing the thermal inactivation. Based on the results, it can be concluded that whilst Arg330 is a conserved residue but not effects on trypsinolysis stability.

Keywords Luciferase; Site-Directed Mutagenesis; Arg330; Proteolysis; Function

CITATION LINKS

[1] The stability of the photogenic material of the Lampyridae and its probable chemical nature [2] Molecular biology of bacterial bioluminescence [3] The effective role of positive charge saturation in bioluminescence color and thermostability of firefly luciferase [4] Fluorescent properties of firefly luciferases and their complexes with luciferin [5] Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared [6] Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals [7] Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica* [8] HO-1 expression in type II pneumocytes after transpulmonary gene delivery [9] Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice [10] Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis [11] 1-1.0 pmol of ATP, ADP, and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase [12] Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties [13] Crosslinking of enzymes for improved stability and performance [14] Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase [15] Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B [16] Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis [17] The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence [18] Design and characterization of novel trypsin-resistant firefly luciferases by site-directed mutagenesis [19] Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis [20] Limited proteolysis of luciferase as a reporter in nanosystem biology: A comparative study

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

*Correspondence

Address: University of Bojnord, 4 Kilometer of Esfarayen Road, Bojnord, North Khorasan, Iran. Postal Code: 9453155111
Phone: +98 (58) 32201000
Fax: -
h.delavari@ub.ac.ir

Article History

Received: August 24, 2017
Accepted: February 17, 2018
ePublished: June 20, 2019

تاثیر جهش در جایگاه ۳۳۰ آنزیم لوسیفراز بر ساختار و عملکرد

سمانه جارچی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

فرنگیس عطایی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

سامان حسینخانی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

لوسیفراز حشره شب تاب (*P. py*) یک آنزیم پراکسیزومی است که موجب تبدیل سوپسترای هتروسیکلیک لوسیفیرین به یک حدواسط اکسی-لوسیفیرین در حضور Mg^{2+} -ATP و اکسیژن مولکولی می‌شود. اکسی-لوسیفیرین برانگیخته با نشر نور مرئی به حالت پایه می‌رسد. لومینسانس به دلایل متعددی از جمله سرعت سنجش، حساسیت بالا و آسان بودن روش کار، کاربرد وسیعی دارد. برخلاف کاربرد متعدد، لوسیفراز در برابر تغییرات فیزیکی و شیمیایی بسیار حساس است بنابراین حساسیت و دقت آن کاهش می‌یابد. لوسیفراز در برابر دماهای بالا و هضم پروتئولیتیکی بسیار ناپایدار است. براساس مطالعات قبلی، با پروتئولیز محدود این آنزیم توسط تریپسین، شش جایگاه برش در دو ناحیه سطحی پروتئین واقع در دمین انتهای N شناسایی شد ۲۰۶-۲۲۰ (شامل R213، R218 و R330) و ۳۲۹-۳۴۱ (شامل R330، K329 و R337). در این مطالعه، جهش‌زایی هدفدار در ناحیه R330 صورت گرفت که آرژنین با گلوتامین جایگزین شد و اثر آن بر ساختار و عملکرد لوسیفراز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج پروتئولیز محدود، این جهش تاثیر قابل توجهی نسبت به نمونه وحشی نداشت اما چندین تغییر مانند تغییر pH ایتیم از ۷/۵ به ۸ و افزایش غیرفعال شدن حرارتی در خصوصیات آنزیم ایجاد کرد. براساس نتایج، اگرچه آرژنین ۳۳۰ یک رزیدوی حفاظت شده است ولی روی پایداری در برابر هضم پروتئولیتیکی تریپسین تاثیری نداشت.

کلیدواژه‌ها: لوسیفراز، جهش‌زایی هدفدار، پروتئولیز، آرژنین ۳۳۰، عملکرد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۴

*نویسنده مسئول: ataei_f@modares.ac.ir

مقدمه

تبدیل انرژی شیمیایی به نور توسط موجودات زنده از دیرباز توجه محققان را به خود جلب نموده است. این پدیده به بیولومینسانس معروف است. واژه بیولومینسانس از دو واژه یونانی بيو به معنی زنده و واژه لاتین لومن به معنی نور تشکیل شده است [1]. اولین بار بیولومینسانس توسط چینی‌ها و سپس ارسطو چهار قرن قبل از میلاد گزارش شده است [2]. آنزیم‌های شرکت‌کننده در این فرآیند را جزء خانواده بزرگی تحت عنوان آسیل-آدنیلات/تیواستر که دارای موتیف مشترک هستند، با نام کلی آنزیم لوسیفراز می‌نامند [3]. لوسیفراز حشره شب تاب آنزیمی پراکسیزومی است که طی دو مرحله، مرحله اول با نقش لیگازی با استفاده از ATP و Mg^{2+} و مرحله دوم با نقش مونواکسیژنازی و با استفاده از O_2 باعث تبدیل سوپسترای خود، لوسیفیرین به ترکیب برانگیخته اکسی-لوسیفیرین می‌شود که در هنگام برگشت به حالت پایه ایجاد نور با بازده کوانتومی بالا می‌کند [4، 5]. در سال‌های اخیر سیستم‌های بیولومینسانس به دلیل ساده بودن روش، سرعت و حساسیت بالا کاربردهای بسیاری در دامنه وسیعی از مطالعات بیولوژی مولکولی، پزشکی و طراحی حسگرهای بیولوژیکی و غیره در شرایط "محیط زنده" و "درون شیشه" دارند. سیستم بیولومینسانس به منظور بررسی رشد تومورها و متابولیت‌ها [6]، ژن گزارشگر [7]، ژن درمانی [8]، تصویربرداری از سلول‌های زنده [9]، مطالعه برهم‌کنش

پروتئین‌ها [10] و سنجش ATP [11] به کار می‌رود. با وجود کاربردهای فراوان، محدودیت‌هایی وجود دارد که استفاده این آنزیم را تحت تاثیر قرار داده است. از جمله مشکلات عمده در لوسیفرازها آسیب‌پذیری چشمگیر آنها در برابر هضم پروتئولیتیکی و ناپایداری آنزیم در دمای بالا است در نتیجه نیمه عمر پروتئین‌ها در شرایط "محیط زنده" و "درون شیشه" کاهش می‌یابد [12]. روش‌های متعددی برای پایدارسازی آنزیم‌ها وجود دارد. از جمله این روش‌ها جهش‌زایی هدفدار [13]، استفاده از اسمولیت‌ها [14]، ایجاد پیوند یونی، ایجاد پیوند دی‌سولفیدی و تثبیت آنزیم [15] است. یکی از راه حل‌های مناسب برای غلبه بر مشکلات موجود در استفاده از لوسیفراز ایجاد جهش است. در آنزیم لوسیفراز حشره شب تاب دو ناحیه انعطاف پذیر (۲۰۶-۲۲۰) و (۳۲۹-۳۴۱) روی دمین N- انتهایی وجود دارد. تیمار این آنزیم در حضور تریپسین و تعیین توالی پپتیدهای حاصل از آن نشان داد که این آنزیم شش جایگاه برش دارد [12]. چهار جایگاه برش (R218، K206، R330، R337) در بین تمامی لوسیفرازها حفاظت شده هستند [16، 17]. جایگاه‌های R213 و R337 از این نواحی توسط ریاحی و همکاران جهش داده شد و خواص آنها مورد بررسی قرار گرفت [18]. در این مطالعه جایگاه آرژنین ۳۳۰ با استفاده از روش جهش‌زایی هدفدار به روش QuickChange جهش داده شد و با اسید آمینه گلوتامین جایگزین شد. بعد از بیان و تخلیص پروتئین جهش‌یافته R330Q وحشی، مطالعات سینتیکی و ساختاری آنزیم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر و جهش‌زایی هدفدار: در این مطالعه پس از این که جایگاه جهش و گزینه اسیدآمینه برای جایگزینی مشخص شد، طراحی پرایمرهایی با کدون‌های جدید برای ورود اسید آمینه مورد نظر صورت گرفت. جهش‌زایی هدفدار از طریق PCR به روش QuikChange انجام شد [19]. در این روش از ژن لوسیفراز نوع وحشی کلون شده در پلاسمید pET16b به عنوان الگو استفاده شد. توالی پرایمر پیشرو استفاده شده برای اعمال تغییرات R330Q در زیر ذکر شده است.

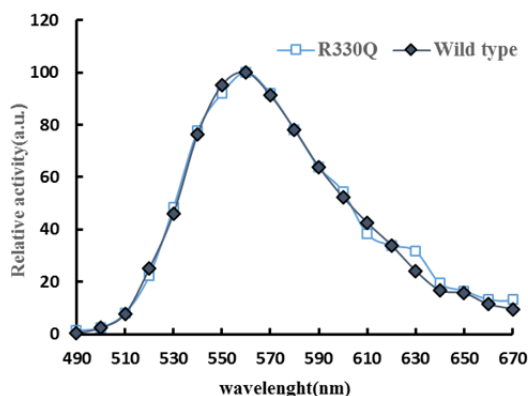
5' GAAGCGTTTGCAAAACAGTTCCATCTTCCAGGGATAC 3' بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و پاکسازی محصول، نمونه‌ها با آنزیم DpnI تیمار و پس از آن محصولات PCR به سویه DH5α به روش شیمیایی منتقل شدند. پس از رشد روی محیط کشت LB-آگار یک تک‌کلونی انتخاب و به محیط LB مایع تلقیح شد. سپس با استفاده از کیت (بیونیر؛ کره جنوبی) استخراج پلاسمید صورت گرفت و به منظور تایید جهش مورد نظر تعیین توالی انجام شد. پس از تایید جهش اعمال شده انتقال پلاسمید حاوی جهش در سویه بیانی BL21 باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) صورت گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین: پروتئین جهش‌یافته و وحشی تحت شرایط یکسان (محیط 2xYT حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، لاکتوز ۴ میلی‌مولار، دمای ۲۲°C، مدت زمان القا ۱۶ ساعت) بیان شدند. بعد از بیان آنزیم‌های جهش‌یافته و وحشی به منظور تخلیص آنزیم‌ها، از روش کروماتوگرافی تمایلی و ستون نیکل سفارز استفاده شد. در نهایت برای حصول اطمینان به منظور تایید حضور و خلوص نمونه‌ها روش الکتروفورز SDS-PAGE و سپس برای سنجش غلظت پروتئین‌ها روش بردفور به کار رفت.

PCR به روش QuikChange روی ژن لوسیفراز نوترکیب در ناقل pET16b انجام شد. سپس محصولات PCR پاکسازی شدند. پس از آن به منظور تکثیر و استخراج ژن لوسیفراز، محصولات به سویه DH5 α انتقال و سپس روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شد. در ادامه استخراج پلاسمید نوترکیب صورت گرفت (شکل ۱) و تعیین توالی انجام شد. به منظور بیان پروتئین لوسیفراز، پلاسمید حامل جهش تایید شده، به سویه بیانی BL21 باکتری *E.coli* به روش شیمیایی انتقال داده شد.

بیان و تخلیص پروتئین لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی: پس از القای آنزیم به منظور بیان بالای آن، آنزیم‌های مورد نظر به روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل سفارز) تخلیص شدند، در ادامه تایید حضور و خلوص نمونه‌ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که میزان خلوص آنزیم‌ها بالای ۹۰٪ است.

اندازه‌گیری و مقایسه طیف نشری بیولومینسانس آنزیم لوسیفراز: یکی از خصوصیات مهم آنزیم لوسیفراز تغییر شیفیت نوری نسبت به تغییرات pH است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از طیف نشری بیولومینسانس در pH خنثی و مقایسه جهش‌یافته با نوع وحشی، مشخص شد که طیف به‌دست‌آمده از جهش‌یافته در این pH کاملاً شبیه به حالت وحشی است و هر دو آنزیم در طول موج ۵۶۰ نانومتر (سبز-زرد) دارای یک پیک ماکزیمم است (نمودار ۱).



نمودار ۱) طیف نشری بیولومینسانس آنزیم لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم علیه زمان (Decay Rate): نمودار فعالیت آنزیم نسبت به زمان شامل دو مرحله است. مرحله زمان افزایش سریع فعالیت و مرحله کاهش فعالیت از حالت حداکثر است. مرحله افزایش سریع فعالیت مربوط به اشباع شدن آنزیم از سوپسترا و مرحله کاهش فعالیت به علت اثر بازدارندگی محصول جانبی دی‌هیدرولوسیفیرین است. کند یا سریع بودن مرحله کاهش فعالیت می‌تواند موجب ایجاد دو فرم مختلف به ترتیب Glow و Flash شود. با توجه به نتایج، سرعت کاهش فعالیت جهش‌یافته R330Q در مقایسه با حالت طبیعی افزایش یافته است (نمودار ۲).

دمای بهینه فعالیت آنزیم: به منظور مطالعه اثر جهش بر تغییرات درجه حرارت بهینه آنزیم جهش‌یافته، نمودار درجه حرارت بهینه در محدوده دمای ۵-۵۰°C رسم شد (نمودار ۳). نتایج نشان می‌دهد که دمای بهینه فعالیت آنزیم R330Q نسبت به حالت وحشی تغییر چندانی نداشته و حدود ۲۵°C است.

سنجش pH بهینه: برای تعیین pH بهینه آنزیم‌های لوسیفراز

اندازه‌گیری و مقایسه طیف نشری بیولومینسانس: طیف نشری بیولومینسانس هر یک از آنزیم‌های لوسیفراز توسط اسپکتروفتومتر لومینسانس در pH خنثی اندازه‌گیری شد. به این منظور حجم ۵۰ میکرولیتر از هر آنزیم به ۲۰ میکرولیتر کوکتل در pH برابر ۷/۸ اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس داده‌ها در طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر جمع‌آوری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم علیه زمان (Decay Rate): فعالیت آنزیم با اضافه کردن ۵ میکرولیتر آنزیم به ترکیبی از ۵۰ میکرولیتر کوکتل و ۴۵ میکرولیتر بافر تریس، به مدت ۲۰ دقیقه و در فاصله زمانی ۳۰ ثانیه خوانده شد.

سنجش دمای بهینه فعالیت آنزیم: دمای بهینه آنزیم با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر و با اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر کوکتل و ۲۲/۵ میکرولیتر بافر تریس پس از انکوباسیون در دماهای ۵-۵۰°C به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سیرکولاتور به ۲/۵ میکرولیتر آنزیم به دست آمد.

سنجش pH بهینه فعالیت آنزیم: در تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفراز ابتدا یک بافر میکس تهیه و محدوده pH بین ۵ تا ۱۰ با فاصله ۰/۵ درجه از آن تهیه شد. این بافر شامل ۱۰۰ میلی‌مولار گلیسین، ۱۰۰ میلی‌مولار سوکسینیک‌اسید و ۵۰ میلی‌مولار تریس/HCL بود. با اضافه کردن ۵ میکرولیتر کوکتل به ۹۰ میکرولیتر بافر میکس و سپس اضافه کردن ۵ میکرولیتر آنزیم خالص‌شده به این مجموعه، فعالیت هر آنزیم در هر pH به دست آمد.

اندازه‌گیری پایداری حرارتی و غیرفعال شدن حرارتی آنزیم: به منظور بررسی پایداری حرارتی، هر آنزیم در دامنه دمایی ۲۰-۴۰°C (با فواصل ۵ درجه‌ای) انکوبه شد. سپس فعالیت باقی‌مانده پس از ۲ دقیقه انکوباسیون آنزیم روی یخ و اضافه کردن ۲/۵ میکرولیتر از آنزیم به ۲۲/۵ میکرولیتر ۵۰ میلی‌مولار تریس/HCL و ۲۵ میکرولیتر کوکتل در دمای ۲۵°C اندازه‌گیری شد اما غیرفعال شدن حرارتی با انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای هر آنزیم در دمای ثابت ۳۰°C در دامنه زمانی صفر تا ۵-دقیقه به فاصله ۵ دقیقه صورت گرفت. فعالیت باقی‌مانده هر آنزیم بعد از انکوباسیون به مدت ۲ دقیقه روی یخ و اضافه کردن ۲/۵ میکرولیتر از آنزیم به کوکتل در دمای ۲۵°C اندازه‌گیری شد.

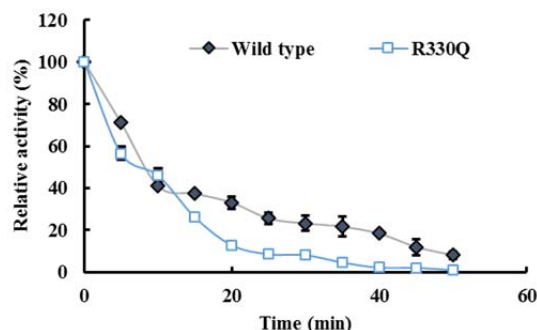
پروتئولیز محدود آنزیم لوسیفراز و سنجش فعالیت آنزیمی طی فرایند پروتئولیز: به منظور بررسی پروتئولیز محدود آنزیم لوسیفراز از سرین پروتئاز تریپسین با نسبت آنزیم به سوپسترا (تریپسین به لوسیفراز) ۱:۱۰۰۰ استفاده شد.

تریپسین ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس/HCL و ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید) و پروتئین لوسیفراز (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۲۳°C انکوبه شدند. سپس در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری صورت گرفت. بعد از پایان زمان انکوباسیون محلول یک میلی‌مولار PMSF به منظور توقف انجام واکنش اضافه شد. سپس مخلوط واکنش همراه با SDS - بتا مرکاپتواتانول در دمای ۹۰°C به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سپس به منظور بررسی هضم پروتئولیتیکی، مخلوط حاصل از واکنش پروتئولیز روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز بارگذاری شد. همچنین فعالیت باقی‌مانده آنزیم لوسیفراز در فواصل زمانی مختلف طی پروتئولیز محدود با استفاده از کمپلکس استاندارد سوپسترا به کمک دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

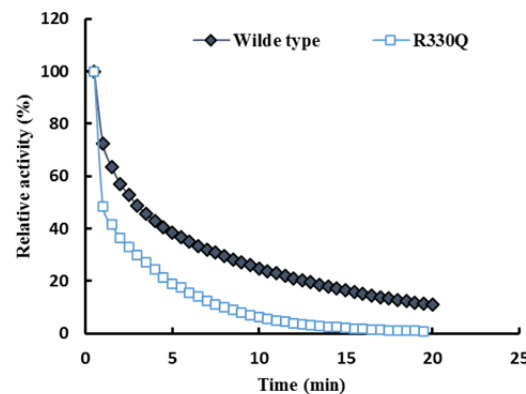
جهش‌زایی هدفدار: بعد از طراحی پرایمرهای مورد نیاز، واکنش

پایداری حرارتی آنزیم جهش‌یافته و وحشی که پس از انکوباسیون در محدوده دمایی $20-40^{\circ}\text{C}$ و به مدت ۵ دقیقه به دست می‌آید، مشاهده می‌شود که پایداری حرارتی آنزیم جهش‌یافته R330Q نسبت به نوع وحشی تا حدودی کاهش یافته است (نمودار ۶).

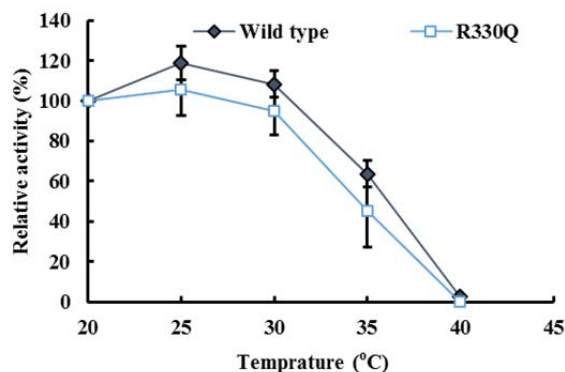


نمودار ۵) غیرفعال‌شدن حرارتی آنزیم لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی

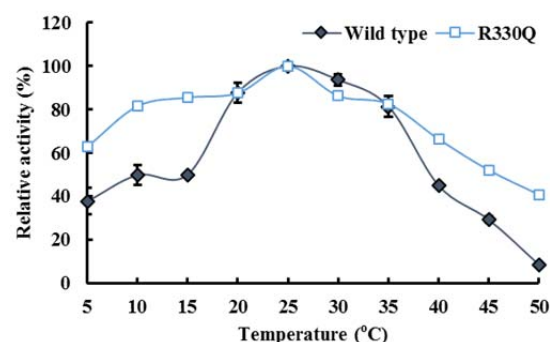
جهش‌یافته و وحشی، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در محدوده pH ۵-۱۰ به فاصله ۰/۵ واحد اندازه‌گیری و نمودار آن در مقایسه با نوع وحشی رسم شد (نمودار ۴). نتایج نشان می‌دهد که در آنزیم جهش‌یافته R330Q، pH بهینه آنزیم حدود ۸ است و در آنزیم نوع وحشی pH بهینه حدود ۷/۵ است.



نمودار ۲) Decay Rate آنزیم لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی



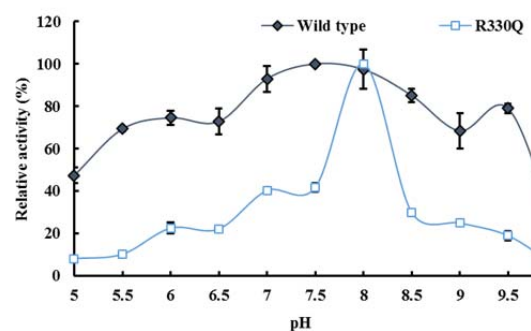
نمودار ۶) پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی



نمودار ۳) درجه حرارت بهینه آنزیم‌های لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی

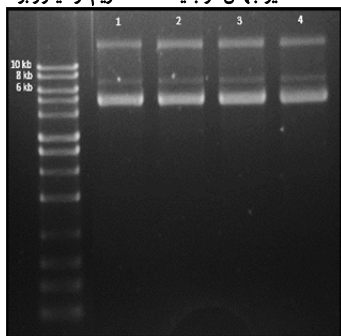
پروتئولیز محدود: پروتئولیز محدود در زمان‌های مختلف توسط پروتئاز تریپسین بررسی شد. از آنجایی که برش در زمان‌های طولانی، زیاد و قطعات ایجاد شده متعدد بودند، مقایسه نهایی آنها بیشتر در زمان‌های اولیه پروتئولیز صورت گرفت. در تمام شرایط پروتئولیز، غلظت پروتئین لوسیفراز ثابت (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. از نسبت‌های مختلف پروتئاز به سوبسترا برای به‌دست‌آوردن شرایط بهینه استفاده شد. در نهایت به‌منظور مشاهده باندهای واضح و قابل بررسی در SDS-PAGE، پروتئولیز در حضور تریپسین با نسبت یک به ۱۰۰ صورت گرفت.

پروتئولیز در زمان‌های صفر، ۳ و ۱۶ ساعت مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۳). نتایج حاصل از پروتئولیز محدود نشان می‌دهد حساسیت آنزیم جهش‌یافته R330Q در مقایسه با حالت وحشی نسبت به هضم پروتئازی تغییرات قابل توجهی ندارد. میزان فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌های جهش‌یافته و وحشی همزمان با نمونه‌برداری به‌منظور بررسی روند پروتئولیز بررسی شد. فعالیت باقی‌مانده هر دو آنزیم در زمان‌های صفر، ۳ و ۱۶ ساعت اندازه‌گیری شد و همان‌طور که در نمودار ۷ مشاهده می‌شود میزان فعالیت باقی‌مانده آنزیم جهش‌یافته نسبت به نمونه وحشی با سرعت بیشتری کاهش می‌یابد.

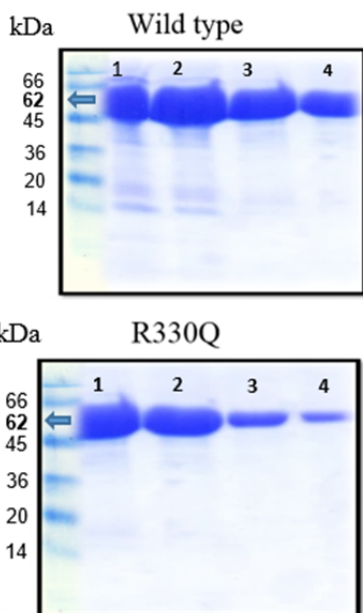


نمودار ۴) pH بهینه آنزیم لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی

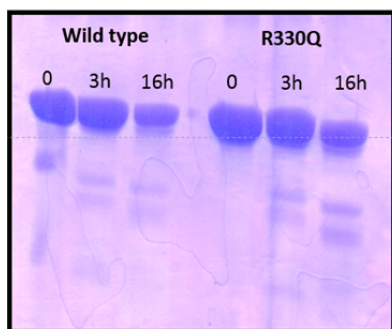
غیرفعال‌شدن و پایداری حرارتی آنزیم: به‌منظور بررسی غیرفعال‌شدن حرارتی آنزیم‌های لوسیفراز جهش‌یافته و وحشی، آنزیم به مدت ۵۰ دقیقه در دمای 30°C انکوبه و میزان فعالیت آنها در فاصله زمانی ۵ دقیقه محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد سرعت غیرفعال‌شدن حرارتی آنزیم جهش‌یافته R330Q نسبت به حالت وحشی افزایش یافته است (نمودار ۵). همچنین با رسم نمودار



شکل (۱) پلاسمیدهای استخراج شده حاوی ژن جهش یافته آنزیم لوسیفراز



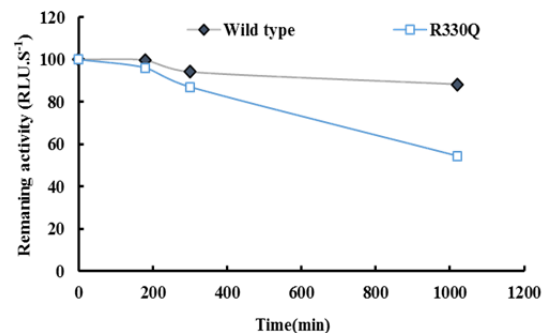
شکل (۲) بررسی خلوص آنزیم لوسیفراز جهش یافته و وحشی: ردیف اول) نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲-۴) نمونه های تخلیص شده به ترتیب خروج از ستون



شکل (۳) ژل SDS-PAGE حاصل از هضم پروتئولیتیک آنزیم لوسیفراز جهش یافته و وحشی در زمان های مختلف

به طور کلی جهش R330Q در جایگاه حساس به پروتئاز صورت گرفت ولی نتایج نشان داد که در حساسیت پروتئازی آنزیم جهش یافته نسبت به نمونه وحشی تفاوت قابل توجهی ایجاد نشد ولی خصوصیات دیگر آنزیم از جمله پایداری حرارتی و فعالیت باقی مانده در حضور پروتئاز نشان داد که این جهش یافته نسبت به نمونه وحشی تا حدودی حساس تر شده است.

پیشنهاد می شود که این جایگاه با اسید آمینه های دیگر به جز گلوتامین جایگزین شده و خصوصیات پروتئین بررسی شود.



نمودار (۷) فعالیت باقی مانده آنزیم لوسیفراز جهش یافته و وحشی در طی پروتئولیز محدود با تریپسین

بحث

در سال های اخیر سیستم های بیولومینسانس به دلیل سرعت، حساسیت بالا و ساده بودن روش سنجش کاربردهای بسیاری در زمینه های مختلف در شرایط "محیط زنده" و "درون شیشه" دارد. با وجود کاربردهای فراوان محدودیت هایی وجود دارد که استفاده این آنزیم را تحت تاثیر قرار داده است. از مهم ترین این محدودیت ها می توان به ناپایداری این آنزیم در دماهای بالا، حساسیت به عوامل محیطی و ناپایداری در برابر پروتئازها اشاره کرد [12, 19]. یکی از راه حل های مفید برای غلبه بر محدودیت های استفاده از لوسیفراز، تولید لوسیفرازهای جهش یافته با ویژگی های مطلوب با استفاده از روش مهندسی ژنتیک است. براساس مطالعات گذشته مشخص شده است که دو ناحیه انعطاف پذیر روی دمین N- انتهایی وجود دارد که در این نواحی شش جایگاه K206, K329, R213, R218, R330 و R337 حساس به برش تریپسین وجود دارد [12, 16, 18, 20]. در این مطالعه جایگاه آرژنین ۳۳۰ که یک ناحیه حفاظت شده است به عنوان جایگاه جهش انتخاب شد و با استفاده از روش جهش زایی هدفدار با اسید آمینه گلوتامین جایگزین شد. سپس اثر این جهش بر ساختار و فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

پس از انجام جهش (شکل ۱) و تایید آن، آنزیم جهش یافته و آنزیم وحشی بیان و تخلیص شدند (شکل ۲). سپس طیف نشری بیولومینسانس آن در PH خنثی بررسی شد. نتایج نشان داد که هر دو آنزیم دارای یک پیک ماکزیمم در طول موج ۵۶۰ نانومتر است (نمودار ۱). نتایج حاصل از Decay Rate نشان داد که سرعت کاهش فعالیت در نمونه جهش یافته نسبت به نمونه وحشی افزایش یافته است (نمودار ۲). دمای بهینه هر دو آنزیم ۲۵°C بوده (نمودار ۳) ولی PH بهینه در نمونه جهش یافته اندکی افزایش یافته است (نمودار ۴). نتایج خواص سینتیکی نشان داد که پایداری حرارتی آنزیم جهش یافته نسبت به حالت طبیعی تا حدودی کاهش یافته (نمودار ۶) ولی سرعت غیرفعال شدن حرارتی آنزیم جهش یافته نسبت به نوع وحشی بیشتر شده است (نمودار ۵). این نتایج می تواند تایید کننده تغییرات ساختاری روی جایگاه فعال آنزیم باشد به طوری که تغییرات ساختاری به گونه ای بود که منجر به کاهش فعالیت و پایداری حرارتی شده است. نتایج حاصل از هضم پروتئولیتیک توسط تریپسین نشان دهنده آن است که آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم وحشی در برابر هضم پروتئازی تغییرات چندانی نداشته (شکل ۳) ولی فعالیت باقی مانده در نمونه جهش یافته نسبت به نمونه وحشی کاهش بیشتری دارد (نمودار ۷).

- 7- Ye L, Buck LM, Schaeffer HJ, Leach FR. Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1339(1):39-52.
- 8- Weng YH, Tatarov A, Bartos BP, Contag CH, Dennerly PA. HO-1 expression in type II pneumocytes after transpulmonary gene delivery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(6):L1273-9.
- 9- Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):377-82.
- 10- Torkzadeh-Mahani M, Ataei F, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis. *Biosens Bioelectron*. 2012;38(1):362-8.
- 11- Spielmann H, Jacob-Müller 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(1):172-8.
- 12- Thompson JF, Geoghegan KF, Lloyd DB, Lanzetti AJ, Magyar RA, Anderson SM, et al. Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18766-71.
- 13- Govardhan CP. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10(4):331-5.
- 14- Ganjalikhany MR, Ranjbar B, Hosseinkhani S, Khalifeh Kh, Hassani L. Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase. *J Mol Catal B Enzym*. 2010;62(2):127-32.
- 15- Yousefi Nejad M, Hosseinkhani S, Khajeh Kh, Ranjbar B. Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(4):740-6.
- 16- Gocht M, Marahiel MA. Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*. 1994;176(9):2654-62.
- 17- Branchini BR, Magyar RA, Murtiashaw MH, Portier NC. The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence. *Biochemistry*. 2001;40(8):2410-8.
- 18- Riahi Madvar A, Hosseinkhani S. Design and characterization of novel trypsin-resistant firefly luciferases by site-directed mutagenesis. *Protein Eng Des Sel*. 2009;22(11):655-63.
- 19- Wang W, Malcolm BA. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*. 1999;26(4):680-2.
- 20- Ataei F, Hosseinkhani S, Khajeh Kh. Limited proteolysis of luciferase as a reporter in nanosystem biology: A comparative study. *Photochem Photobiol*. 2009;85(5):1162-7.

همچنین جایگاه‌های دیگر حساس به برش تریپسین، به صورت دوتایی همراه با این جایگاه جهش داده و تاثیر همزمان جایگزینی در دو جایگاه حساس به پروتئولیز ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

جهش‌زایی هدفدار در جایگاه R330 واقع در نواحی سطحی آنزیم لوسیفراز انجام شده و آرژنین با گلوتامین جایگزین شد. با این جایگزینی، برخی از خصوصیات آنزیم جهش‌یافته مانند pH ایتیم (افزایش از ۷/۵ به ۸) و غیرفعال‌شدن حرارتی (افزایش) تغییر کرد. با توجه به این که این جایگاه، حساس به برش توسط تریپسین گزارش شده بود^[12]، ولی براساس نتایج پروتئولیز محدود، جهش‌یافته جدید بر پایداری در برابر هضم پروتئولیتیکی تریپسین تاثیری نداشت.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس ابراز می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سمانه جارچی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪); فرنگیس عطایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪); سامان حسین‌خانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)
منابع مالی: منابع مالی تحقیق حاضر از محل اعتبار پژوهشی پایان‌نامه نویسنده اول تامین شده است.

منابع

- 1- Alex McDermott F. The stability of the photogenic material of the Lampyridae and its probable chemical nature. *J Am Chem Soc*. 1911;33(11):1791-7.
- 2- Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev*. 1991;55(1):123-42.
- 3- Said Alipour B, 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(6):847-55.
- 4- Dementieva EI, Fedorchuk EA, Brovko LY, Savitskii AP, Ugarova NN. Fluorescent properties of firefly luciferases and their complexes with luciferin. *Biosci Rep*. 2000;20(1):21-30.
- 5- McElroy WD, DeLuca M, Travis J. Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science*. 1967;157(3785):150-60.
- 6- Cook SH, Griffin DE. Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals. *J Virol*. 2003;77(9):5333-8.