

بررسی اثر حلال بسازودگداز کولین کلرید: گلیسرول بر ویژگی‌های سینتیکی آنزیم وحشی و جهش یافته لوسیفراز

فرشته رحمتی¹، امین تشکر²، سامان حسینخانی^{3*}، اکبر حیدری⁴

1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران

3- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

4- استاد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، صندوق پستی 14115-175

Saman_h@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 92/11/4 پذیرش مقاله: 94/4/9)

چکیده- لوسیفراز حشره شب‌تاب، یک آنزیم مولد نور است که در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولی استفاده می‌شود. لوسیفراز کاربرد گسترده‌ای در بسیاری از حوزه‌های آنالیز ژنتیکی نظیر ردیابی بیان ژن، سنجش ژن گزارشگر و مطالعات پروتئومیکس نظیر برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین دارد. با وجود مزیت‌هایی که این آنزیم دارد، محدودیت‌هایی نیز در سامانه‌های مبتنی بر لوسیفراز وجود دارد که مهمترین آن‌ها پایداری پایین آنزیم است. یکی از جدیدترین روش‌هایی که برای حل این مشکل توسعه یافته است، استفاده از حلال‌های بسازودگداز (DES) است. یک گروه از حلال‌های بسازودگداز از نمک آلی همراه با یک دهنده هیدروژن ساخته می‌شود که به سبب آن، پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی باعث کاهش نقطه ذوب آن نسبت به هر یک از ترکیبات سازنده می‌باشد. در تحقیق حاضر، اثرات این حلال روی ویژگی‌های سینتیکی آنزیم لوسیفراز *Lampyrus turkestanicus* وحشی و جهش یافته ($E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$) بررسی شد. بدین منظور، آنزیم‌های وحشی و جهش یافته در BL21 بیان گردید و پروتئین‌های مورد نظر از طریق کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و برای مطالعات سینتیکی استفاده شد. در اینجا از حلال کولین کلراید-گلیسرول به عنوان حلال بسازودگداز استفاده گردید. با توجه به نتایج، پایداری دمایی لوسیفراز وحشی در حلال DES نسبت به جهش یافته بسیار بیشتر است. همچنین، فعالیت باقی‌مانده هر دو آنزیم وحشی و جهش یافته در حضور حلال DES نسبت به عدم حضور آن بیشتر است.

کلیدواژگان: لوسیفراز، حلال‌های بسازودگداز، پایداری دمایی.

1- مقدمه

واکنشگر و آنزیم را میسر می‌سازد، بلکه تعیین کننده روند مراحل کار، بازیافت آنزیم و نیز استراتژی‌های حذف محصولات ناخواسته از محیط می‌باشد. لذا در این راستا،

انتخاب حلال مناسب در محیط کاتالیز آنزیمی از اهمیت زیادی برخوردار است. حلال نه تنها تماس مؤثرتر بین

بسازودگداز بر نرخ فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و وابستگی میزان فعالیت آنزیم به نسبت مولی حلال بسازودگداز آشکار شد [2].

پایداری قابل توجه آنزیم‌ها در حلال‌های بسازودگداز اخیراً در کار Verpoote و همکارانش به صراحت بیان شد. لذا با توجه به چنین پیشینه‌ای از به‌کارگیری حلال‌های بسازودگداز به منظور افزایش فعالیت و پایداری آنزیم‌ها، حلال بسازودگداز کولین کلراید:گلیسرول به عنوان حلال انتخابی برای بررسی کاتالیز آنزیمی لوسیفراز انتخاب شد [6].

در این بررسی آنزیم لوسیفراز متعلق به گونه *Lampyrus turkestanicus* انتخاب شد. ژن لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* به اندازه 85/3% با *Photinus pyralis* شباهت دارد. cDNA کد کننده این لوسیفراز 1644 bp می‌باشد و پلی پپتیدی به اندازه 547 اسید آمینه را کد می‌کند. آنالیزهای فیلوژنتیک توالی آمینواسید این گونه ایرانی تأیید کرد که این گونه متعلق به زیرخانواده *Lampyridae* است. اندازه پروتئین لوسیفراز 62 kDa است و نور ساطع شده از آن سبز رنگ می‌باشد [7]. آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب یک آنزیم مونواکسیژناز (EC. 1.13.12.7) بوده و نشر نور سبز-زرد رنگ را از لوسیفرین، ATP، اکسیژن و Mg^{2+} کاتالیز می‌کند. واکنش آغازی لوسیفراز حشره شبتاب، تشکیل کمپلکس لوسیفراز-لوسیفریل آدنیلات (Luc: LH2-AMP) در حضور Mg^{2+} و ATP می‌باشد که با رها شدن پیروفسفات غیر آلی (PPi) همراه می‌باشد. در این واکنش ناحیه کربوکسیل لوسیفرین آدنیله می‌گردد [8-11]. این آنزیم به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف از جمله تصویربرداری مولکولی، ژن درمانی، غربالگری مهارکننده‌های آنزیمی، ردیابی بیان ژن در محیط زنده، تکنیک BRET و سیستم‌های گزارشگر دوگانه مورد استفاده قرار می‌گیرد [12-16].

با تمام کاربردهای اشاره شده، آنزیم لوسیفراز همانند

انتخاب و به کارگیری محیط‌های ایمن و ارزان جهت کاتالیز، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در سال‌های اخیر حلال‌های یونی در بین دیگر حلال‌ها به میزان قابل ملاحظه‌ای مورد توجه واقع شده‌اند. گرچه در این زمینه نتایج ارزنده‌ای گزارش شده، ولی کاستی‌های اکولوژیک و اقتصادی فرایندهای مبتنی بر این گروه از حلال‌ها برای کاربردهای صنعتی، در سطح غیرقابل پذیرشی قرار دارد. بر همین مبنا، اخیراً نسل جدیدی از حلال‌ها با عنوان حلال‌های بسازودگداز معرفی شده‌اند. این حلال‌ها با وجود داشتن تشابهاتی با حلال‌های یونی، حلال‌هایی ارزان و ایمن برای کاتالیز به شمار می‌آیند [1].

اولین استفاده از حلال‌های بسازودگداز به کار Kazalaukas و همکارانش در سال 2008 برمی‌گردد [2]. در این کار تأثیر چند حلال بسازودگداز بر عملکرد آنزیم‌های مختلف کاتالیز کننده واکنش ترانس استریفیکاسیون اتیل والرات با بوتانول مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت مشاهده شد که حلال‌های بسازودگداز کولین کلراید:گلیسرول و کولین کلراید:آوره به عنوان حلال‌های همراه، جهت واکنش‌های کاتالیز شونده توسط هیدرولازها بسیار سودمند می‌باشند، به طوری که در این مورد، حلال‌های بسازودگداز، سرعت واکنش را تا حدود 20 برابر افزایش داد.

تأثیر مثبت حلال‌های بسازودگداز بر آنزیم‌های گروه هیدرولازی کمی بعد در کار Widersten و همکارانش تأیید شد [3]. در این بررسی، در بین حلال‌های بسازودگداز مختلف، مخلوط بسازودگداز کولین کلراید:گلیسرول، کارآمدترین محیط معرفی شد.

در سال 2011 Zhao و همکارانش استفاده از حلال‌های بسازودگداز مبتنی بر کولین استات و گلیسرول را به عنوان دهنده تجدیدپذیر پیوند هیدروژنی برای واکنش ترانس استریفیکاسیون کاتالیز شونده توسط لیپاز را گزارش کردند [4,5]. در پژوهش‌های بعدی فاکتورهای متعدد از جمله تأثیر تغییر نسبت مولی اجزای حلال‌های

بیشتر آنزیم‌های مزوفیل پایداری اندکی داشته، لذا با در نظر داشتن نکات ذکر شده در خصوص پتانسیل‌های پایدارکنندگی و افزایش دهندگی فعالیت آنزیمی توسط حلال‌های بسازودگداز، در این مطالعه اثر حلال کولین کلراید: گلیسرول بر فعالیت و پایداری آنزیم لوسیفراز متعلق به گونه *Lampyrus turkestanicus* در دو شکل آنزیم وحشی و یک نوع جهش یافته از این آنزیم به صورت $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا رقت بهینه (جهت سنجش آنزیمی) حلال بسازودگداز تهیه شد و در ادامه متغیرهای سیستمی همچون روند فعالیت آنزیم علیه زمان، دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیمی، پایداری حرارتی، و فعالیت باقی‌مانده آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت [4,3]. لازم به ذکر است که حضور لوسیفراز جهش یافته غنی از آرژنین در سطح پروتئین در این مطالعه، امکان بررسی مقایسه‌ای تأثیر حضور آمینواسیدهای باردار سطحی را با نمونه آنزیم لوسیفراز وحشی میسر می‌سازد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

D-Luciferin (Resem BV -The Netherlands) potassium salt، مواد محیط کشت (Sigma)، ATP (Roche)، IPTG و کانامایسین از (Sigma)، ستون pET28a (Novagene) Ni-NTA Sepharose و (Novagene).

2-2- دستگاه‌ها

Luminometer (Berthold)، UV-Visible Spectrophotometer (Varian)، Fluorescence Spectrophotometer (PerkinElmer LS55).

2-3- بیان، تخلیص و سنجش غلظت پروتئین‌ها:

به منظور انجام سنجش‌های آنزیمی، نیاز به بیان بالای

آنزیم‌ها و خالص‌سازی آنها می‌باشد. پس از القای ژن لوسیفراز مورد نظر جهت بیان بالای آن (over expression)، به منظور تخلیص آنزیم‌های مورد نظر از روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل-سفارز) استفاده شد. آنزیم‌های نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی (His_6 -tag) در انتهای آمین (N-terminal) خود می‌باشند. این دنباله هیستیدینی دارای تمایل زیادی به نیکل بوده و میانکشی محکمی با آن برقرار می‌کند. در آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) استفاده شد. بافر جدا کننده (Elution Buffer) حاوی 300 mM NaCl، 250 mM Imidazole، 50 mM Tris/HCl با pH 7/8 می‌باشد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. در نهایت برای حصول اطمینان جهت تأیید حضور و خلوص نمونه‌ها از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد و سپس برای سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد و در هر مورد با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه‌های آنزیمی مشخص شد [17].

4-2- تهیه حلال بسازودگداز

حلال منتخب در این مطالعه کولین کلراید:گلیسرول به نسبت مولی 1:2 بوده که برای ستر آن می‌بایست دو ماده جامد شیمیایی خالص را با توجه به نسبت مولی صحیح در داخل بشر مخلوط نموده و با حرارت دهی غیرمستقیم در داخل ژل سیلیکون و در حضور مگنت در دمای حدود $70^{\circ}C$ و برای مدت زمان تقریبی 60 دقیقه مخلوط شده تا در نهایت مایع شفاف‌ی که همان حلال بسازودگداز است حاصل شود.

5-2- تعیین رقت بهینه از حلال بسازودگداز

تعیین رقت بهینه از حلال بسازودگداز به منظور انجام

فاصل 5 درجه‌ای) یک‌بار در حضور بافر تریس و بار دیگر در حضور حلال به مدت 5 دقیقه انکوبه شد و سپس فعالیت باقی‌مانده پس از 2 دقیقه انکوباسیون روی یخ و افزودن 25 میکرولیتر از کمپلکس سوپسترا با دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد. به همین ترتیب غیر فعال شدن حرارتی نیز انجام گرفت ولی در دمای ثابت 30°C و در دامنه زمانی 0-50 دقیقه با فواصل زمانی 5 دقیقه‌ای انجام شد. فعالیت باقی‌مانده آنزیم به صورت درصد فعالیت اولیه گزارش شد.

3- نتایج

پس از القای ژن آنزیم جهت بیان بالای آن (over expression) و تخلیص آنزیم‌های مورد نظر به روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل سفارز)، تأیید حضور و خلوص نمونه‌ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE و غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد مشخص شد [17]. در ادامه پس از سنتز حلال بسازودگداز کولین کلراید: گلیسرول به نسبت مولی 1:2، پیش از انجام سنجش‌های آنزیمی بعدی، رقت بهینه حلال تعیین شد، تا سنجش‌ها در شرایط بهینه از نسبت مناسب حلال به حجم کلی سنجش انجام شوند.

3-1- رقت بهینه از حلال بسازودگداز

پس از تهیه رقت بهینه از حلال بسازودگداز و سنجش آنزیمی در رقت‌های نهایی به صورت $v/v\%$ از حلال بسازودگداز نسبت به کل حجم سنجش و در مقادیر (80%، 70%، ...، 20%، 10%، 5%) مشخص شد که میزان فعالیت آنزیمی با افزایش غلظت حلال و متعاقباً افزایش گرانروی آن، کاهش می‌یابد. به طوری که بهترین رقت در این بین، رقت 10% در حجم نهایی سنجش آنزیم لوسیفرافراز بود، لذا این رقت از حلال به عنوان نسبت بهینه برای سایر بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت (شکل 1).

سایر سنجش‌های آنزیمی ضروری است. در ابتدا سریال رقتی از حلال بسازودگداز به صورت $v/v\%$ از حلال بسازودگداز نسبت به کل حجم سنجش و در مقادیر (80%، 70%، ...، 20%، 10%، 5%) آماده کرده و فعالیت 5 میکرولیتر از آنزیم لوسیفرافراز در حضور 25 میکرولیتر از کمپلکس سوپسترا (2 mM ATP، 1mM Luciferin، 5mM Mg^{2+} و 50 mM Tris/HCl) و 20 میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده از حلال بسازودگداز مورد بررسی قرار گرفت. در مقابل، فعالیت هر دو آنزیم در حضور 20 میکرولیتر از بافر 50mM tris (به عنوان کنترل منفی) بررسی شد و پس از مقایسه نتایج، رقت بهینه حلال بسازودگداز در حجم نهایی سنجش آنزیمی تعیین گردید.

2-6- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم علیه زمان

فعالیت آنزیم با افزودن 5 میکرولیتر از آنزیم به 25 میکرولیتر از کمپلکس سوپسترا و 20 میکرولیتر از حلال بسازودگداز در رقت بهینه به عنوان کنترل مثبت و بار دیگر 20 میکرولیتر از بافر تریس به عنوان کنترل منفی در بازه زمانی 390 ثانیه و با فواصل هر 30 ثانیه یکبار به کمک دستگاه لومینومتر انجام گرفت.

2-7- بررسی دمای بهینه آنزیم وحشی و جهش یافته

به منظور تعیین دمای بهینه آنزیم ابتدا 20 میکرولیتر از حلال و 25 میکرولیتر از کمپلکس سوپسترا به مدت 5 دقیقه در دامنه‌ی دمایی 40-5 درجه سانتی‌گراد (با فواصل 5 دقیقه‌ای) انکوبه شد و سپس بلافاصله با افزودن 5 میکرولیتر آنزیم فعالیت آنزیمی به کمک دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد. به همین ترتیب فعالیت آنزیم در حضور بافر تریس نیز اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت.

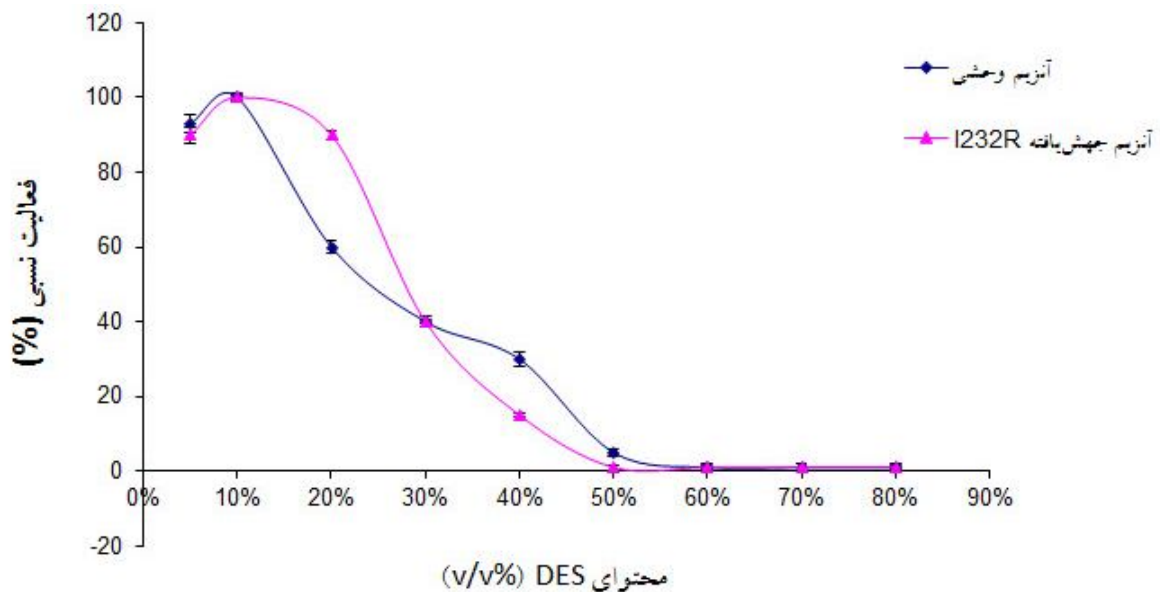
2-8- اندازه‌گیری غیرفعال شدن و پایداری حرارتی آنزیم

به منظور بررسی پایداری حرارتی، هر آنزیم با غلظت 0/02mg/ml در دامنه دمایی 20-50 درجه سانتی‌گراد (با

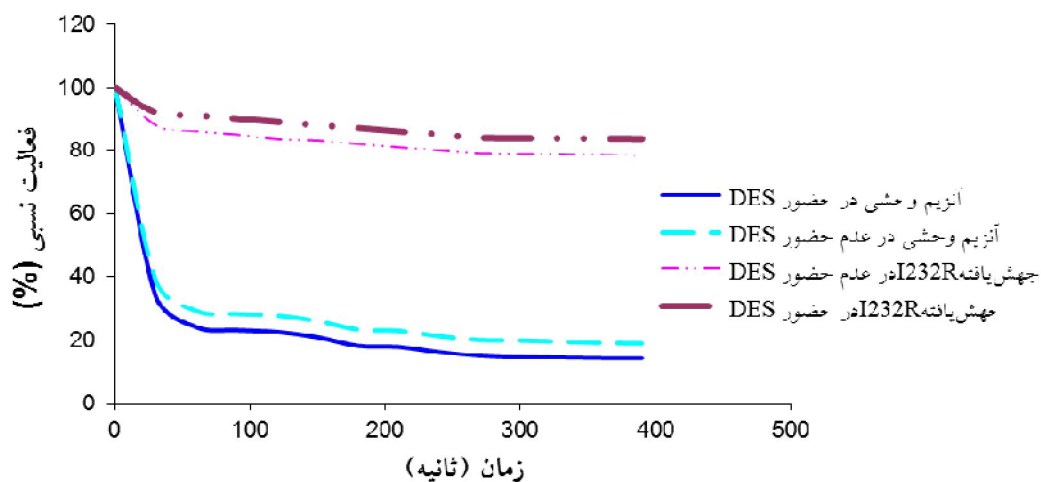
3-2- فعالیت آنزیم علیه زمان

بررسی فعالیت آنزیم علیه زمان در حضور حلال و بافر
برای آنزیم لوسیفرافز وحشی و جهش یافته نشان داد که نرخ

کاهش فعالیت آنزیمی در حضور حلال بسازودگداز در مورد
آنزیم جهش یافته کاهش یافته است، در حالی که این متغیر،
برای آنزیم وحشی اندکی افزایش داشت (شکل 2).

اثرات غلظت های مختلف DES

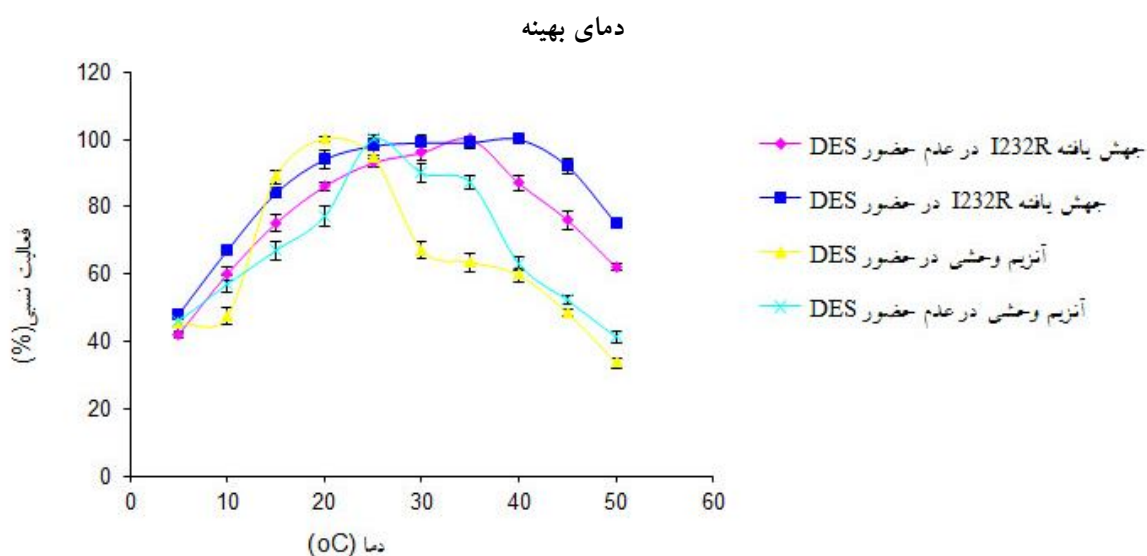
شکل 1 نمودار فعالیت نسبی آنزیم لوسیفرافز وحشی و جهش یافته آنزیم جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در غلظت های مختلف DES. آنزیم جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

میران تنزل فعالیت آنزیمی

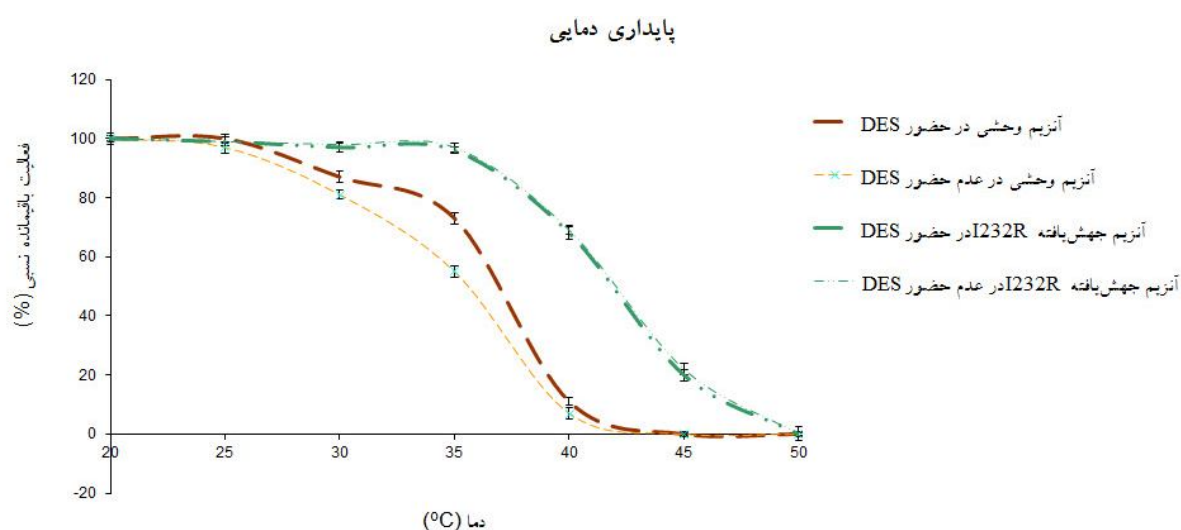
شکل 2 نمودار میزان تنزل فعالیت آنزیم. در این نمودار فعالیت آنزیم های وحشی و جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در زمان های مختلف در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

3-3- دمای بهینه آنزیم وحشی و جهش یافته

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دمای بهینه آنزیم وحشی در حضور حلال، نسبت به دمای بهینه فعالیت در عدم حضور آن 5°C کاهش یافته، حال آنکه دمای بهینه فعالیت برای جهش یافته $\text{I}^{232}\text{R} - \text{E}^{354}\text{R}/\text{Arg}^{356}$ در حضور حلال، نسبت به دمای بهینه فعالیت در عدم حضور آن 5°C افزایش داشت (شکل 3).



شکل 3 دمای بهینه آنزیم‌های وحشی و جهش یافته $\text{I}^{232}\text{R} - \text{E}^{354}\text{R}/\text{Arg}^{356}$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته $\text{I}^{232}\text{R} - \text{E}^{354}\text{R}/\text{Arg}^{356}$ در شکل به اختصار I^{232}R نوشته شده است.



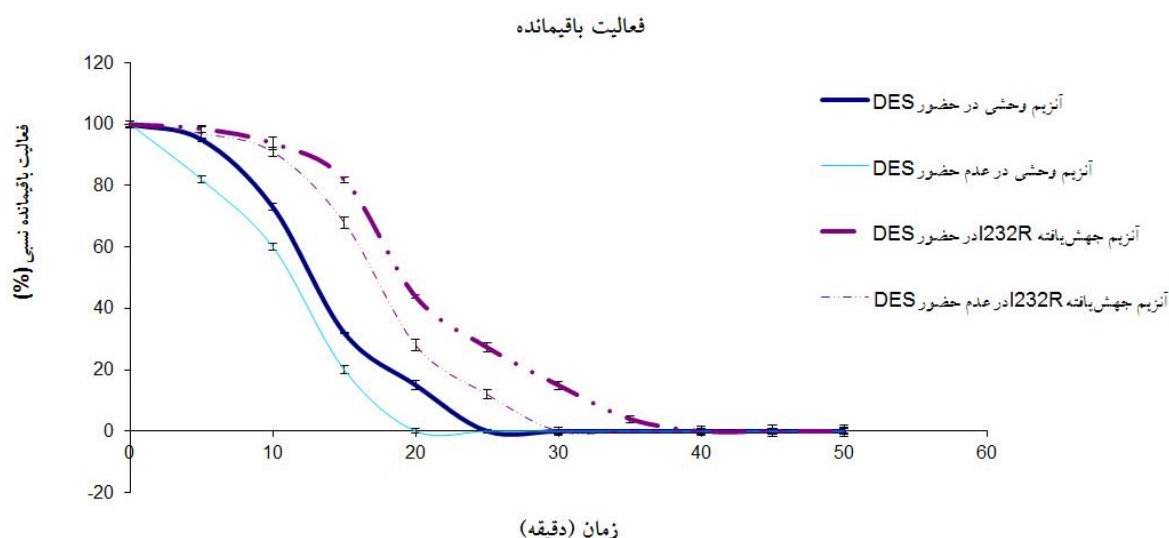
شکل 4 پایداری دمایی آنزیم‌های وحشی و جهش یافته $\text{I}^{232}\text{R} - \text{E}^{354}\text{R}/\text{Arg}^{356}$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته $\text{I}^{232}\text{R} - \text{E}^{354}\text{R}/\text{Arg}^{356}$ در شکل به اختصار I^{232}R نوشته شده است.

گروه از حلال پرداخته شد. حلال‌های بسازودگداز خانواده‌های متنوعی دارد، از این‌رو این حلال‌ها را بسته به نیاز و با توجه به خواص مختلف فیزیکوشیمیایی مثل نقطه ذوب (بسیار پایینتر از اجزای تشکیل دهنده اولیه)، ویسکوزیته (عموماً دارای ویسکوزیته بالا هستند)، چگالی (با افزایش نسبت نمک آلی به گروه پیوند هیدروژنی دهنده افزایش می‌یابد)، قطبیت (که با تغییر نسبت نمک آلی به گروه پیوند هیدروژنی دهنده، قابل تغییر است) و هدایت یونی (با توجه به ویسکوزیته بالا، اغلب هدایت یونی پایینی دارند) باید انتخاب کرد [20]. با در نظر گرفتن این نکات و پیشینه‌ای که استفاده از این حلال‌ها در کاتالیز آنزیمی دارند، ترکیب بسازودگداز کولین کلراید: گلیسرول به نسبت مولی 1:2 برای استفاده در محیط کاتالیز آنزیمی انتخاب شد. در ابتدا پیش از انجام سنجش‌های آنزیمی بعدی، لازم بود رقت بهینه حلال تعیین شود. در نتیجه با بررسی مقادیر (v/v%) (80، 70، 20، 10، 5) مشخص شد که میزان فعالیت آنزیمی با افزایش غلظت حلال و متعاقباً افزایش گرانیوی آن، کاهش می‌یابد. به طوری که بهترین رقت در این بین، رقت 10% در حجم نهایی سنجش آنزیم لوسیفراز بود.

میزان غیر فعال شدن حرارتی هر دو آنزیم (جهش‌یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ و آنزیم لوسیفراز وحشی) در حضور حلال نسبت به محیط کاتالیز محتوی تریس با کاهش همراه بود، به دیگر بیان، فعالیت باقی‌مانده آنزیمی با گذشت زمان در حضور حلال نسبت به محیط محتوی بافر بیشتر بود (شکل 5).

4- بحث

حلال‌های بسازودگداز به عنوان گروه ویژه‌ای از حلال‌های یونی و به منظور رفع نقایص حلال‌های یونی (سمیت و پرهزینه بودن)، در اوایل قرن حاضر معرفی شدند و در سال‌های اخیر به عنوان حلال‌های سبز در حوزه صنعت و پژوهش بسیار مورد توجه قرار گرفتند [18]. با توجه به کاربردهای متعدد آنزیم لوسیفراز در حوزه‌های مختلف [19]، بهینه‌سازی خواص عملکردی و ساختاری این آنزیم از اهمیت بسزایی برخوردار است. با توجه به خواص حلال‌های بسازودگداز و امکان اعمال تغییر خواص مختلف آنزیمی در حضور این حلال‌ها، در این مطالعه به بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آنزیم‌های لوسیفراز طبیعی و جهش یافته در حضور این



شکل 5 فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356} - I^{232}R$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

در این خصوص می‌توان اذعان داشت که کاهش فعالیت آنزیمی در غلظت‌های بالاتر حلال، پدیده‌ای مستقل از اثر حلال بر دنا توره شدن پروتئین بوده و در عوض این امر به دلیل کاهش شانس برخورد مؤثر آنزیم و سوبسترا در غلظت‌های بالای حلال و ویسکوزیته زیاد آن می‌باشد. از سوی دیگر، این حلال‌ها ممکن است بر کمپلکس‌های حدواسط واکنش یا آنزیم-سوبسترا تأثیر ناپایدارکنندگی داشته باشند. در ادامه فعالیت آنزیم علیه زمان در حضور و عدم حضور حلال بررسی شد، در حالت کلی نمودار فعالیت آنزیم علیه زمان شامل دو مرحله یکی مرحله زمان افزایش سریع و دیگری مرحله کاهش فعالیت از حالت حداکثر می‌باشد. مرحله افزایش سریع مربوط به اشباع شدن آنزیم از سوبسترا (لوسیفرین و ATP) و مرحله کاهش فعالیت به علت اثر بازدارندگی محصول جانبی دی هیدرولوسیفرین (Dehydroluciferin) است. نتایج این بررسی نشان داد که سرعت مرحله کاهشی در مورد آنزیم جهش یافته در حضور حلال کاهش یافته است. از آنجا که کاهش نور مربوط به اثر بازدارندگی محصول جانبی واکنش است، احتمالاً حلال بسازودگداز با کند کردن روند تخریب این حدواسط، این روند را کاهش می‌دهد. در تفسیر روند افزایشی فعالیت آنزیم علیه زمان در مورد آنزیم وحشی در حضور حلال در مقایسه با عدم حضور آن می‌توان به پایین‌تر بودن میزان فعالیت ویژه آنزیم وحشی نسبت به جهش یافته اشاره کرد، به طوری که در مورد آنزیم وحشی با کمتر بودن فعالیت ویژه محصول جانبی کمتری در واحد زمان در محیط خواهیم داشت و لذا اثرگذاری حلال از این طریق کمتر خواهد شد.

به منظور مطالعه اثر حلال بر تغییرات درجه حرارت بهینه آنزیم جهش یافته و وحشی، نمودار درجه حرارت بهینه در محدوده دمایی 5 تا 50 درجه سانتی‌گراد رسم گردید. نتایج حاصل نشان می‌دهد که دمای بهینه آنزیم جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356}-I^{232}R$ در حضور حلال نسبت به

نمونه کنترل $5^{\circ}C$ افزایش داشت، در مقابل آنزیم وحشی در حضور حلال $5^{\circ}C$ کاهش داشت. این نحوه اثرگذاری حلال احتمالاً ناشی از تغییر در محتوای ساختار دوم آنزیم می‌باشد.

با رسم نمودار پایداری حرارتی آنزیم‌های جهش یافته و وحشی که پس از انکوباسیون در محدوده دمایی 20 تا 50 درجه سانتی‌گراد و به مدت 5 دقیقه به دست می‌آید مشاهده می‌شود که آنزیم لوسیفرز وحشی در حضور حلال پایدارتر شده است. همچنین نمودار فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌های جهش یافته و وحشی پس از انکوباسیون در دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه در محدوده زمانی 0 تا 40 دقیقه رسم گردید که نتایج نشان می‌دهد انکوباسیون هر دو آنزیم در حضور حلال، منجر به پایدارتر شدن آنزیم نسبت به محیط واکنش بافری می‌شود. به عنوان یک توصیف احتمالی در افزایش پایداری حرارتی می‌توان به فشرده‌تر شدن ساختار در حضور این حلال اشاره کرد، که نتیجتاً از دنا توره شدن حرارتی آنزیم ممانعت می‌کند. در ضمن به دلیل قابلیت این حلال در برقراری پیوندهای هیدروژنی با آنزیم در محیط واکنش، این حلال قادر خواهد بود تغییرات ساختاری در آنزیم لوسیفرز اعمال کند.

در مقایسه با حلال‌های یونی، حلال بسازودگدازها دارای مزایای متعددی می‌باشند که از جمله می‌توان به کم هزینه بودن، خنثی بودن (از نظر شیمیایی نسبت به آب)، تهیه آسان، زیست تخریب پذیر، سازگاری با محیط زیست، نداشتن سمیت اشاره کرد [1] و از آنجا که در مبحث کاتالیز آنزیمی انتخاب حلال کم هزینه و ایمن بسیار حائز اهمیت است به کارگیری حلال‌های بسازودگداز در حیطه پژوهش و صنعت بسیار مورد توجه است.

با در نظر گرفتن این نکات و با توجه به خواص ذکر شده برای حلال‌های بسازودگداز و امکان اعمال تغییر خواص مختلف آنزیمی از جمله خواص سینتیکی و ساختاری،

- [7] Said Alipour, S. Hosseinkhani, M. Nikkhah, H. Naderi-Manesh, M.J. Chaichi, S.K. Osaloo, *Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus**. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **325**(1): p. 215-22.
- [8] McElroy, W. and A. Green, *Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin*. Archives of biochemistry and biophysics, 1956. **64**(2): p. 257-271.
- [9] McElroy, W.C.R.a.W.D., *The Synthesis and Function of Luciferyl-adenylate and Oxyluciferyl-adenylate*. J. Biol. Chem, 1958. **233**(6): p. 1528-1537.
- [10] Seliger, H. and W. McElroy, *Chemiluminescence of firefly luciferin without enzyme*. Science, 1962. **138**(3541): p. 683-685.
- [11] DeLuca, M. and W.D. McElroy, *Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions*. Biochemistry, 1974. **13**(5): p. 921-925.
- [12] Bhaumik, S. and S.S. Gambhir, *Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **8**(99): p. 377-82.
- [13] Weng, Y.H., A. Tatarov, B.P. Bartos, C.H. Contag, P.A. Dennerly, *HO¹-expression in type II pneumocytes after transpulmonary gene delivery*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2000. **278**(6): p. 1273-9.
- [14] Roda, A., P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini and M. Guardigli, *Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(60): p. 295-303.
- [15] Moradi, A., S. Hosseinkhani, H. Naderi-Manesh, M. Sadeghizadeh and B.S. Alipour, *Effect of charge distribution in a flexible loop on the bioluminescence color of firefly luciferases*. Biochemistry, 2009. **48**(3): p. 575-82.
- [16] Branchini, B.R., R.A. Magyar, M.H. Murtiashaw, S.M. Anderson, L.C. Helgeson and M. Zimmer, *Site-directed mutagenesis of firefly luciferase active site amino acids: a proposed model for bioluminescence color*. Biochemistry, 1999. **38**(5): p. 13223-30.
- [17] Marion M., Bradford., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of*

مقایسه پارامترهای مختلف آنزیمی (طبیعی و جهش یافته‌ها) در حضور و عدم حضور این حلال‌ها حائز اهمیت بوده و مزایا و محدودیت‌های به کارگیری چنین حلال‌هایی را آشکار می‌سازد. آنچه که از نتایج این تحقیق حاصل شد این است که حلال‌های بسازودگداز را نمی‌توان به عنوان یک قاعده کلی برای بهبود ویژگی‌های سینتیکی پیشنهاد داد. این حلال اثرات متفاوتی روی آنزیم وحشی و جهش یافته دارد و در برخی شرایط همچون دمای بهینه اثرات کاملاً معکوسی مشاهده گردید، هرچند برخی موارد نیز بهبود ویژگی‌های سینتیکی را نشان داد و این می‌تواند به دلیل وابستگی شدید این حلال‌ها به آمینواسیدهای سطحی پروتئین باشد.

5- مراجع

- [1] Zhang, Q., K. Vigier, S. Royer and F. Jerome, *Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(21): p. 7108-7146.
- [2] Gorke, J.T., F. Srienc, and R.J. Kazlauskas, *Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents*. Chemical Communications, 2008(10): p. 1235-1237.
- [3] Lindberg, D., M. de la Fuente Revenga, and M. Widersten, *Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis*. Journal of biotechnology, 2010. **147**(3): p. 169-171.
- [4] Zhao, H., G.A. Baker, and S. Holmes, *New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel*. Organic & biomolecular chemistry, 2011. **9**(6): p. 1908-1916.
- [5] Zhao, H., G.A. Baker, and S. Holmes, *Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. **72**(3): p. 163-167.
- [6] Choi, Y.H., J. Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. Arends, G. Witkamp, and R. Verpoorte, *Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?* Plant physiology, 2011. **156**(4): p. 1701-1705.

- [19] Taha Azad, Amin Tashakor, Saman Hosseinkhani, *Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(23): p. 5541-5560.
- [20] Hua Zhao, G.A.B.a.S.H., *New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel*. Org Biomol Chem, 2011. **9**(6): p. 1908-1916.
- protein-dye binding*. Anal Biochem., 1976. **7**(72): p. 248-54.
- [18] Kevin R. J. Lovelock, A.E., Sook Fun Loh, Shuang Men, Peter Licence and Darren A. Walsh, *On the diffusion of ferrocenemethanol in room-temperature ionic liquids: an electrochemical study*. Phys. Chem. Chem. Phys, 2011. **13**: p. 10155-10164.