زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورۀ 3، شمارۀ 2، پاییز و زمستان 1391

نقش پل نمکی در سطح در دسترس باقیمانده های آمینواسیدی آنزیم α -آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA) و اثر آن بر پایداری حرارتی با ایجاد فشردگی موضعی

رزیتا زنوزی[1*]، خسرو خواجه[2]، مجید منجمی[3]، ناصر قائمی[4]

1- دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
2- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استاد شیمی، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
4- استادیار بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

***تهران، صندوق‌پستی 446-16535**

Roseata_Zonouzi@yahoo.com
(دریافت مقاله: 90/12/28، پذیرش: 91/1/19)

چکیده - باقی‌مانده‌های آمینواسیدی 185 – 177 (ناحیه I یا لوپ) در آنزیم α –آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA) بخشی از محفظه (Cage) اتصال به کلسیم را می‌سازد. لوپ موجود در BAA دو باقی‌مانده آمینواسیدی بیشتر از همتای گرمادوست خود یعنی α –آمیلاز *B. licheniformis* (BLA) دارد و Arg_{176} موجود در این بخش با Glu_{126} ناحیه II (باقی‌مانده‌های آمینواسیدی 131 – 118) یک پل نمکی می‌سازد؛ این ارتباط در آنزیم BLA به‌خاطر جایگزینی‌های $R_{176}Q$ و $E_{126}V$ حذف شده است. همچنین پایداری حرارتی آنزیم BAA، وابستگی زیادی به یون کلسیم دارد. در این پژوهش، اثر پل نمکی در پایداری حرارتی آنزیم بررسی شد. برای مشخص شدن اهمیت ساختاری و عملکردی پل نمکی، ابتدا مدل مولکولی جهش‌یافته ΔE_{126} به شکل تئوری ساخته شده و سپس موقعیت و آثار آمینواسیدهای دو منطقه I و II با برنامه‌های GETAREA و WHAT IF بررسی شد؛ پس از آن، جهش گفته‌شده با جهش‌زایی هدفمند در ژن BAA ایجاد و پایداری حرارتی آنزیم جهش‌یافته و وحشی با هم مقایسه شد. نتایج به‌دست‌آمده از مدل مولکولی نشان داد که وجود پل نمکی با اثر بر آمینواسیدهای آب‌دوست و آب‌گریز موجود در دو منطقه I و II، جلوی نفوذپذیری آنزیم به آب، خروج کلسیم و غیرفعال شدن حرارتی آنزیم را می‌گیرد. پایداری حرارتی آنزیم وحشی نسبت به سایر جهش‌یافته‌ها نیز نتایج بالا را تأیید کرد.

کلید واژگان: α -آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA)، جهش‌زایی هدفمند، پایداری حرارتی، پل نمکی، لوپ.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

1- مقدمه

در میان آنزیم‌های مؤثر بر نشاسته، α-آمیلاز (E.C 3,2,1,1) اهمیت ویژه‌ای دارد [1] و به‌گونه‌ی گسترده‌ای بررسی شده است [2]. هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدهای α-آمیلازهای *B. amyloliquefaciens* (BAA) و *B. licheniformis* (BLA)، 80 درصد یکسانی (Identity) و87 درصد شباهت (Similarity) نشان می‌دهد. ساختارهای x-ray [3،۴] این آنزیم نشان داده که کلسیم، عامل بسیار مهمی در درستی ساختار، پایداری حرارتی و فعالیت آنزیمی می‌باشد [1،۵].

مطالعات پیشین نشان داده که لوپ موجود در دو آنزیم که شامل باقی‌مانده‌های آمینواسیدی 185-177 (ناحیهٔ I) است، سازنده بخشی از محفظه (Cage) متصل به کلسیم است [3،۶،۷] و افزایش آب‌گریزی و تغییر در بار باقی‌مانده‌های آمینواسیدی لوپ، سبب افزایش پایداری حرارتی آنزیم می‌شود [8]. ناحیه I در آنزیم BAA (شکل 1) دو اسیدآمینه (Glu_{178}, Gly_{179}) بیشتر از BLA دارد؛ از طرفی Arg_{176} موجود در این ناحیه یک برهم‌کنش یونی با Glu_{126} از ناحیه II (باقی‌مانده‌های 131 – 118) دارد که این برهم‌کنش در BLA به‌خاطر جایگزینی‌های $Arg_{176}Gln$ و $Glu_{126}Val$ حذف شده است [4].

برای بررسی نقش برهم‌کنش یونی بالا در پایداری ساختاری و حرارتی آنزیم BAA، مدل مولکولی آنزیم جهش‌یافته ΔE_{126} ساخته و موقعیت و اثرگذاری باقی‌مانده‌های آمینواسیدی مختلف در ساختار وحشی با مدل جهش‌یافته مقایسه شد، سپس جهش گفته‌شده با روش جهش‌زایی هدفمند (Site-directed mutagenesis) روی ژن BAA ایجاد شد و آنزیم جهش‌یافته و وحشی از لحاظ پایداری حرارتی مقایسه شدند.

BAA 117 E V N P A N R N Q **E** T S E E Y
BLA 119 E V D P A D R N R **V** I S G E H
BAA .171 R I F K F R G **E G** K A W
BLA 172 R I Y K F Q G - - K A W

شکل 1 هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدی پیرامون باقی‌مانده‌های آمینواسیدی Glu_{126} و Arg_{176} در BAA (PDB Code 3BH4) و BLA (PDB Code 1BLI).

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد شیمیایی

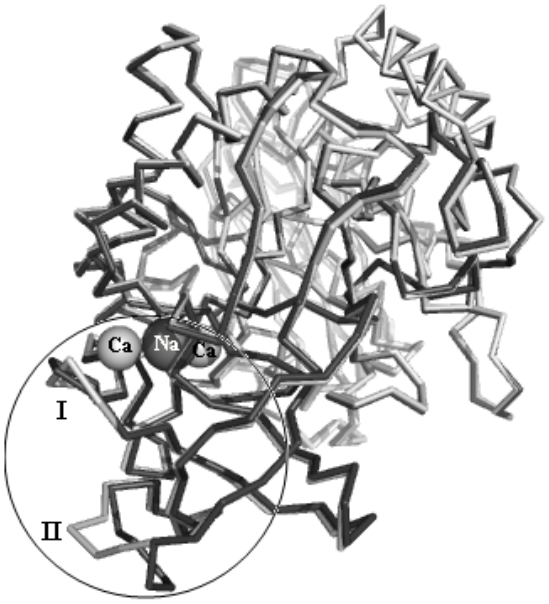
اولیگونوکلئوتیدهای مورد نیاز در شرکت MWG آلمان سنتز شد. کیت استخراج DNA ژنومی از شرکت Real Biotech تایوان و آنزیم PWO (DNA Polymerase from *Pyrococcus Woesei*) از شرکت Roche آلمان خریداری شد. آنزیم‌های برش دهنده، T_4 لیگاز، Dpn1، (Isopropyl-β-D-1 thiogalacto Pyranoside) IPTG و محلول‌های مورد نیاز برای PCR از شرکت Fermentase آلمان تهیه شد. Ni-NTA آگارز از Amersham و وکتور pET21a از شرکت Novagen آمریکا خریداری شد. *Escherichia coli* XL1 Blue و *E. coli* BL21 (DE3) از شرکت Stratagene آمریکا تهیه گردید.

2-2- ساخت مدل

پس از ایجاد جهش در آنزیم BAA (PDB Code 3BH4) و حذف Glu_{126}، از Swiss- Model Protein Modeling Server برای ساخت مدل استفاده شد [9]. برای ارزیابی مدل ساخته‌شده، محاسبه (Root Mean Square Deviation) RMSD بعد از جفت شدن (Iterative fitting) و انطباق

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

مولکول وحشی و جهش یافته (شکل2) انجام شد. سطح دردسترس حلال برای باقی‌مانده‌های آمینواسیدی مختلف با برنامه GETAREA [10] تعیین شد. علاوه بر این، ساختار پروتئین وحشی و نمونه جهش‌یافته با برنامه WHAT IF [11] ارزیابی شد.



شکل 2 مدل انطباق مولکولی آنزیم BAA وحشی (سیاه) و جهش یافته (خاکستری) که بر اساس ساختار کریستالی *B.amyloliquefaciens* α-amylase بدست آمده (رشته A) و نواحی I و II درآن نشان داده شده است. شکل‌ها با برنامه Pymol 0.99v طراحی شده است.

2-3- انواع سویه‌های باکتری، پلاسمید و شرایط رشد

Bacillus amyloliquefaciens (ATCC 23350)، جداسازی شده از نمونه‌های خاک، از مرکز جمع‌آوری باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی ایران تهیه شد. *Escherichia coli* XL1 Blue و *E. coli* BL 21 (DE3) به‌ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان استفاده شد. محصول PCR در وکتور بیانی pET 21a (+) کلون شد. *Bacillus amyloliquefaciens* در محیط کشت شامل (g/L): 5 پپتون، 3 عصاره گوشت، 15 آگار و 0/01 $MnSO_4$. H_2O در دمای 30 °C کشت داده شد. سویه *Escherichia coli*، 12 ساعت در محیط کشت LB (Luria Bertani) در 37 °C [12] کشت داده شد.

3-4- کلون کردن ژن BAA در pET21a

DNA ژنومی به وسیلهٔ کیت استخراج DNA ژنومی جداسازی شد. در طراحی پرایمرها، توالی کدکننده پپتید سیگنال‌دهنده، (Signal peptide) حذف و جایگاه برش آنزیم‌های برش دهنده (Restriction site) *Nde*I و *Not*I به ترتیب در '5 و '3 قرار داده شد.

N-5'GGAATTCCATATGGTAAACGGTACGCTGATGCAG-3' (forward)

C-5'ATAAGAATGCGGCCGCTTTCTGAACATAAATGGAGACGG-3' (reverse)

ژن α- آمیلاز با استفاده از DNA خالص‌شده با روش واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تکثیر شد. محصول PCR با آنزیم‌های برش دهنده *Nde*I و *Not*I هضم و با آنزیم T_4DNA لیگاز به pET21a دارای جایگاه برش (در دمای 37°C به مدت 12 ساعت) وصل شد [13]. سپس مخلوط به *E.coli* XL1 Blue انتقال داده شد [14]. برای تأیید مراحل کلون‌سازی، محصول به‌وسیله‌ی شرکت MWG آلمان با پرایمرهای پیشرو و خاتمه T_7 تعیین توالی شد.

5-2- جهش‌زایی هدفمند

جهش‌زایی هدفمند با روش QuikChange انجام شد [15]. یک جفت اولیگونوکلئوتید با توالی‌های زیر طراحی شد:

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

ΔGlu126 forward:
5-'GGCCAATAGAAATCAG|ACTTCGGAGGAATATC-3'
ΔGlu126 reverse:
5-'GATATTCCTCCGAAGT|CTGATTTCTATTTGGCC-3'

مخلوط PCR در حجم نهایی 50 µl شامل: 0/2 µg از DNA الگو، 10 x بافر PCR، 15 µM از هر پرایمر، 0/2 mM از هر dNTP و آنزیم PWO پلی‌مراز (1/25 unit) بود. مخلوط در 95°C، 5 دقیقه حرارت داده شد و سپس در 22 سیکل دمایی در 95°C، 1 دقیقه، در 55°C، 1 دقیقه و در 68°C، 13 دقیقه قرار داده شد. برای هضم رشته الگو، محصول PCR همراه DpnI، 2 ساعت در 37°C انکوبه شد. محصول پس از خالص‌سازی به *E.coli* XL1 Blue انتقال داده شد و پنج کلونی به صورت تصادفی انتخاب و برای تأیید جهش، تعیین توالی شد.

2-6- بیان و خالص‌سازی پروتئین وحشی و جهش‌یافته

پلاسمید بیانی ساخته‌شده به *E.coli* BL 21 (DE3) انتقال داده شد. باکتری‌های حامل ژن BAA وحشی و جهش‌یافته در دمای 37 °C، 12 ساعت در 10 ml محیط کشت LB دارای 100 mg/ml آمپی‌سیلین رشد داده شد. در ادامه 1500 µl از کشت شبانه به 300 ml محیط کشت تازه افزوده شد. پس از رسیدن OD_{600} به محدوده 0/6، IPTG در غلظت نهایی 1/5 mM به محیط کشت افزوده و 12 ساعت در 22 °C انکوبه شد. سلول‌های کشت‌یافته به وسیله سانتریفوژ مدل Hettich Rotina 380R Benchtop Centrifuge (5000 g ، 15 دقیقه) در 4 °C جمع‌آوری و به وسیله سونیکاتور در بافر شامل 50 mM Tris-HCl، NaCl 50 mM (pH= 7/5) در 4 °C لیز شد. باقیمانده‌های سلولی به وسیله سانتریفوژ (6000 g، 15 min) جمع‌آوری شده و در بافر لیزکننده (50 mM Tris-HCl، 300 mM NaCl، 6 M Urea، pH= 7/5) 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. محصول با دیالیز متوالی در غلظت‌های 0، 1، 2، 3 و 4 مولار اوره تاخوردگی مجدد شد. باقیمانده‌های سلولی به وسیله سانتریفوژ (10000 g، 20 دقیقه) در 4°C زدوده شده و محلول رویی برای مراحل خالص‌سازی استفاده شد. نمونه به‌دست‌آمده به وسیله ستون Ni-NTA آگارز با روش Amersham Bioscience خالص‌سازی شد.

2-7- تعیین فعالیت آنزیمی و غلظت پروتئین

α- آمیلاز در دمای 37 °C با استفاده از نشاسته سیب‌زمینی به عنوان سوبسترا در بافر شامل 50 mM Tris-HCl، NaCl 50 mM و $CaCl_2$ 10 mM در pH= 7/5 سنجش شد. غلظت قندهای احیاکننده به‌دست‌آمده از واکنش کاتالیز آنزیمی به وسیله دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به روش برنفیلد [16] اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین با روش لوری [17] تعیین شد.

2-8- غیرفعال شدن حرارتی آنزیم‌ها

آنزیم BAA خالص، وحشی و جهش‌یافته، در بافر حاوی 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl و $CaCl_2$ 10 mM در pH= 7/5 و در دمای 80 °C، در مدت زمان‌های متفاوت انکوبه شدند. نمونه‌ها بعد از سرد شدن در یخ سنجش شده و فعالیت باقی‌مانده آن‌ها در دمای 37°C

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

اندازه‌گیری شد. منحنی درصد فعالیت باقیمانده آنزیم‌ها در برابر زمان (شکل 4) رسم شد.

3- یافته‌ها و بحث

3-1- مدل‌سازی کامپیوتری

پس از ساخت مدل جهش‌یافته، برای ارزیابی آن و بررسی شباهت ساختار سه‌بعدی دو مولکول، RMSD کئوردیناسیون‌های اتمی C_α اندازه‌گیری شد. بر این اساس، ساختار پروتئین وحشی و جهش‌یافته از لحاظ انرژی و موقعیت فضایی باقی‌مانده‌های آمینواسیدی، بهینه‌سازی، جفت و بر هم منطبق شد. نتایج به‌دست‌آمده (جدول 1) نشان‌دهنده بهینه بودن مدل ایجادشده است.

جدول 1 RMSD به‌دست‌آمده از انطباق مولکولی آنزیم وحشی و جهش‌یافته برای C_α و اسکلت کربنی در نواحی I و II.

RMSD (A°)		
Regions	**C_α**	**Backbone**
I_{170}-G_{180}(I)	3/07	0/55
N_{120}-E_{131}(II)	3/03	0/66

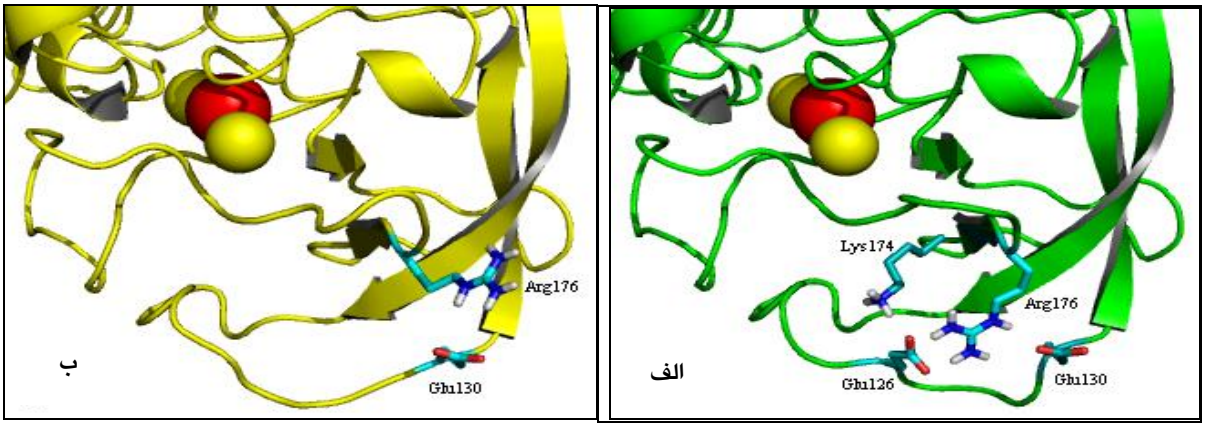
3-2- ارزیابی و مقایسه مدل آنزیمی وحشی و جهش‌یافته

ساختار آنزیم وحشی و نمونه جهش‌یافته در مدل‌های تئوری با برنامه WHAT IF [11] مقایسه شد. این مقایسه نشان داد که در مدل وحشی، اسیدآمینه Arg_{176} دارای دو برهم‌کنش یونی با Glu_{126} و Glu_{130} است و Glu_{126} نیز با Arg_{176} و Lys_{174} برهمکنش دارد؛ اما بعد از حذف Glu_{126}، Arg_{176} تنها با Glu_{130} برهم‌کنش دارد (شکل 3). Glu_{126} از نظر موقعیت مکانی تقریباً در نیمه‌ی ناحیه I (باقی‌مانده‌های آمینواسیدی 131-118) قرار گرفته است و از نظر فاصله به Arg_{176} نزدیک‌تر است و همان‌گونه که در ساختار مدل مشاهده می‌شود (شکل 3) این اسیدآمینه نقش مؤثرتری در کشیدگی ناحیه I به سمت II داشته و Glu_{130} که در فاصله بیشتری از Arg_{176} قرار گرفته و برهم‌کنش ضعیف‌تری با آن دارد، نقش بسیار کمی ایفا می‌کند.

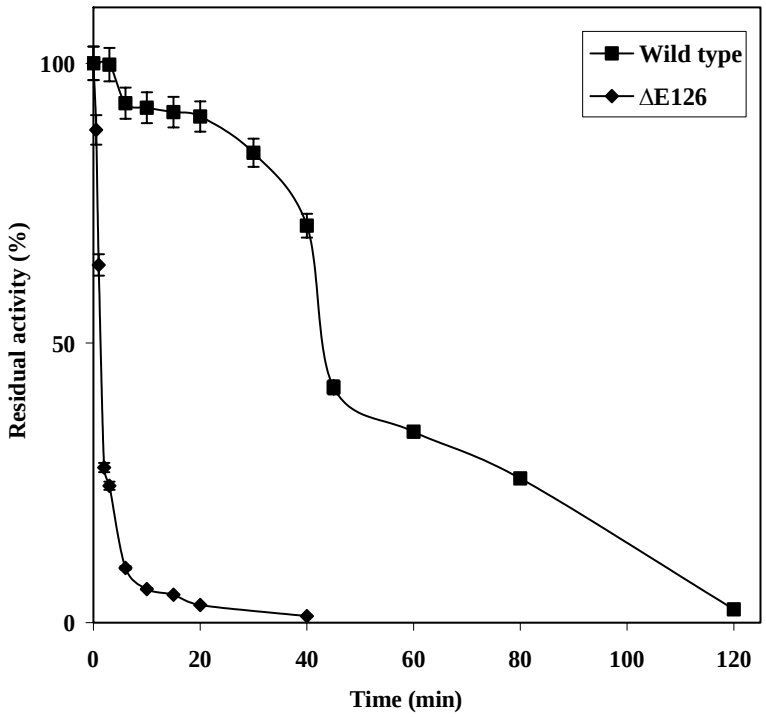
در بررسی‌های پیشین نیز نشان داده شد که وجود برهم‌کنش گفته‌شده از طریق کاهش انعطاف‌پذیری نواحی I و II در پایداری حرارتی آنزیم مؤثر است [18].

با بررسی دقیق مدل‌ها، چرخش چشم‌گیری در باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز دو ناحیه I و II مشاهده می‌شود. این شرایط با محاسبه سطح در دسترس برای هر باقی‌مانده آمینواسیدی و زنجیر جانبی‌اش با برنامه GETAREA [10] در مدل پروتئینی وحشی و جهش‌یافته (جدول 2) نشان داده شده است. بر این اساس در ناحیه II در اثر جهش، سطح در دسترس باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست، افزایش یافته است که برای نمونه، چرخش $Asn_{119,124}$، Thr_{127}، Ser_{128} و Glu_{130} به سطح خارجی آنزیم است. باقی‌مانده‌های آمینواسیدی این ناحیه تا حد زیادی در بخش سطحی آنزیم است و معمولاً میزان آب‌گریزی و در دسترس بودن آمینواسیدها باهم رابطه معکوس دارد [19]؛ بنابراین حضور پل نمکی در آنزیم وحشی، باقی‌مانده‌های آب‌دوست را به داخل آنزیم جهت داده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]



شکل 3 الف- پل نمکی به‌دست‌آمده از برهم‌کنش Arg_{176} با Glu_{126} و Glu_{130} و نیز Glu_{126}با Arg_{176} و Lys_{174} در آنـزیم وحشـی، ب- برهم‌کنش یونی بین Glu_{130} و Arg_{176} در آنزیم جهش‌یافته. کره قرمز، یون سدیم و زرد، یون کلسیم را نشان می‌دهد.



شکل 4 غیرفعال شدن دمایی آنزیم BAA وحشی (■) و جهش‌یافته (◆) در بافر 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl و pH=7/5 در دمای 80°C در حضور 10mM CaCl2. انحراف استاندارد مقادیر عددی حدود 5 درصد به دست آمد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

در ناحیه I یا لوپ نیز سطح در دسترس باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز افزایش یافته است. با توجه به این‌که در لوپ‌ها معمولاً آب‌گریزی سطح داخلی بالاست [20]، تغییرات برجسته‌ای که در آمینواسیدهای Arg_{176} (چرخش به خارج لوپ و کاهش کشش) و Lys_{175} (چرخش به داخل لوپ) بعد از جهش رخ داده، سبب کاهش برهم‌کنش‌های آب‌گریز در سطح داخلی لوپ و گسترش فاصله بین دو منطقه (I و II) می‌شود (شکل3)؛ در حالی که یکی از ویژگی‌های چشم‌گیر در ساختارهای پروتئینی، فشردگی آن‌ها است [21 و 22].

در مجموع، جهش، سبب نفوذپذیری بیشتر منطقه II به آب و هدایت آن از طریق حفره ایجادشده بین دو منطقه، به سمت ناحیه I شده و خروج کلسیم را سبب می‌شود.

3-3- غیرفعال شدن حرارتی

دناتوراسیون حرارتی آنزیم‌ها، معمولاً با تخریب اتصالات غیرکووالان شامل برهم‌کنش‌های آب‌گریز انجام می‌شود [23]. برای درک نقش پل نمکی بین Glu_{126} و Arg_{176} در مدل تئوری، سرعت غیرفعال شدن دمایی آنزیم وحشی و جهش‌یافته در دمای 80°C در حضور 10 mM $CaCl_2$ تعیین شد. همان طور که در منحنی 4 نشان داده شده، آنزیم وحشی و جهش یافته به ترتیب نیمه‌عمرهایی برابر 43 و 1/2 دقیقه دارند که نشان‌دهنده حساسیت بالای آنزیم جهش‌یافته به حرارت است.

بعد از جهش، به‌خاطر چرخش باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست منطقه II به سطح خارجی آنزیم، نفوذپذیری این ناحیه به آب بیشتر شده و سبب ورود آب به حفره ایجادشده در حد فاصل منطقه I و II می‌شود. حفره ایجادشده، حاصل کاهش فشردگی منطقه در اثر حذف پل نمکی است؛ زیرا برهم‌کنش Arg_{176}و Glu_{126} سبب کشیدگی منطقه II به سمت I و فشردگی موضعی در آنزیم می‌شود. این نبود فشردگی حاصل از جهش، خود سبب نفوذپذیری ناحیه I به آب می‌شود. حذف Glu_{126} به‌خاطر کاهش کشیدگی در Arg_{176} باعث چرخش اسکلت کربنی آنزیم در ناحیه لوپ و کاهش برهم‌کنش‌های آب‌گریز در سطح داخلی آن می‌شود و از آن‌جا که بخشی از باقی‌مانده آمینواسیدی موجود در لوپ، سازنده محفظه اتصال کلسیم به آنزیم است، تغییرات گفته‌شده بعد از جهش، به‌ویژه در دماهای بالا که آنتروپی مولکول‌های آب زیاد است، سبب نفوذ آب به منطقه I و خروج کلسیم می‌شود و چون غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم BAA یک سازوکار وابسته به کلسیم است [18]، حذف برهم‌کنش سبب ناپایداری حرارتی آنزیم BAA می‌شود.

درمجموع، برهم‌کنش یونی Arg_{176} و Glu_{126} با اثر بر باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز دو منطقه I و II و ایجاد فشردگی در ساختار، در پایداری حرارتی آنزیم BAA نقش حیاتی دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که حتی تغییر یک اسیدآمینه می‌تواند شبکه یونی و در نتیجه ساختار آنزیم را تغییر داده و بر پایداری ساختاری و حرارتی آن مؤثر باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

جدول 2 درصد سطح در دسترس باقی مانده‌های آمینواسیدی مدل آنزیمی وحشی و جهش یافته در نواحی I و II.

Residues (Region I)	Ratio(%) In/Out				Residues (Region II)	Ratio(%) In/Out			
	Wild-type		Mutant			Wild-type		Mutant	
Ile 172	21/1		13/8	i	Thr 114	51/8	o	22/1	
Phe 173	0/00	i	0/00	i	Ala 115	0/00	i	0/00	i
Lys 174	15/7	i	21/4		Val 116	0/20	i	6/00	i
Phe 175	0/00	i	0/00	i	Glu 117	21/0		43/3	
Arg 176	34/4		62/9	o	Val 118	0/00	i	0/00	i
Gly 177	46/6		17/6	i	Asn 119	27/9		62/1	o
Glu 178	100	o	74/4	o	Pro 120	77/0	o	86/1	o
Gly 179	69/4		91/4	o	Ala 121	91/2	o	100	o
Lys 180	6/50	i	1/00	i	Asn 122	45/1		53/6	o
Ala 181	83/6	o	81/1	o	Arg 123	7/50	i	6/40	i
Trp 182	3/40	i	5/60	i	Asn 124	55/2	o	74/9	o
Asp183	0/00	i	0/00	i	Gln 125	51/1	o	19/5	i
Trp 184	71/9	o	59/9	o	Glu 126	38/0		-	-
Glu 185	27/7		25/4		Thr 127	35/0		100	o
Val 186	0/10	i	0/00	i	Ser 128	18/9	i	68/0	o
Ser 187	0/80	i	1/50	i	Glu 129	92/0	o	59/6	o
Ser 188	66/0		53/5	o	Glu 130	55/6	o	43/0	

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

4- مراجع

[1] Nielsen, J.E., Borchert, T.V. (2000) Protein engineering of bacterial α-amylases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1543, 253-274.

[2] MacGregor, E.A., Janecek, S., Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1546, 1-20.

[3] Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G. (1998) Activation of *Bacillus licheniformis* α-amylase through a disorder→order transition of the substrate-binding site mediated by calcium–sodium–calcium metal triad. *Structure*. 6, 281-292.

[4] Alikhajeh, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Lin, Y. H., Liu, E., Guan, H.H., Hsieh, Y.C., Chuankhayan, P., Huang, Y.C., Jeyaraman, J., Liu, M.Y., Chen, C.J. (2010) The Crystal Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase at High Resolution: Implications for Thermal Stability. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 121-129.

[5] Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N., Fischer, E. H. (1959) Metal content of α-amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 234, 2901-2905.

[6] Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. (1995) Crystal structure of calcium depleted Bacillus licheniformis α-amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 246, 545-559.

[7] Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. (2000) Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 301, 1041-1057.

[8] Suzuki,Y., Ito, N., Yuuki, T., Yamagata, H., Udaka, S. (1989) Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* alpha-amylase against irreversible thermoinactivation. *J. Biol. Chem.* 264, 18933-18938.

[9] Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids. Res.* 31, 3381–3385.

[10] Fontana, A., Zambonin, M., de Filipis, V., de Laureto, P.P. (1995) Limited proteolysis of cytochrome c in trifluoroethanol. *FEBS. Lett.* 362, 266–270.

[11] Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8, 52-56.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]

[12] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[13] Haghani, K., Khajeh, Kh., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B. 2012. Evidence regarding the hypothesis that the histidine-histidine contact pairs may affect protein stability. *Int. J. Biol. Macromol*. 50: 1040-1047.

[14] Chung, C.Y., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-steppreparation of competent *Escherichia coli:* transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.

[15] Fisher, C.L., Pei, G.K. (1997) Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Bio.Techniques.* 23, 570-574.

[16] Bernfeld, P. (1955) Amylase, α and β. *Methods. Enzymol.* 1, 149-151.

[17] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

[18] Zonouzi, R., Khajeh, K., Monajjemi, M., Ghaemi, N. (2013) the role of salt bridge between Arg_{176} and Glu_{126} in the thermal stability of α-amylase of *B. amyloliquefaciens* (BAA). *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 7-14.

[19] Samanta, U., Bahadur, R.P., Chakrabarti, P. (2002) Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein. Eng.* 15, 659-667.

[20] Hirakawa, H., Kuhara, S. (1999) The hydrophobic cores of proteins predicted by wavelet analysis. *Bioinformatics*. 15, 141-148

[21] Chothia,C. Structural invariants in protein folding. (1975*) Nature.* 254, 304–308.

[22] Richards, F.M. (1977) Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 151–176.

[23] Daniel, R.M. (1996) the upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme. Microb. Tech.* 19, 74-79.

[24] Tanaka, A., Hoshino, E. (2002) Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase determined by inactivation kinetics. *Biochem. J.* 364, 635-639.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-04-04]