بررسی تأثیر حلال بسازودگداز مبتنی بر کولین بر واکنش بیولومینسانس آنزیم لوسیفراز وحشی و جهش یافته غنی از آرژنین

فرشته رحمتی[۱]، امین تشکر[۲]، سامان حسینخانی[۱*] و اکبر حیدری[۱]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

[۲] تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۵

چکیده

حلال‌های بسازودگداز (DES) در واکنش‌های آنزیمی، از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشند. این حلال‌ها تماس موثر بین واکنشگر و آنزیم را میسر می‌سازد و از اینرو می‌تواند موجب افزایش پایداری و فعالیت آنزیم شود. بیولومینسانس پدیده تولید و نشر نور توسط موجودات زنده است. واکنش شیمیایی اصلی در بیولومینسانس شامل رنگدانه مولد نور لوسیفرین، و آنزیم لوسیفراز می‌باشد.آنزیم لوسیفراز اکسیداسیون لوسیفرین را کاتالیز می‌کند که به مولکول حامل انرژی آدنوزین‌تری‌فسفات نیاز دارد. لوسیفراز به دلیل محصولی که به سهولت قابل ردیابی است، کاربردهای فراوانی در بیوتکنولوژی و زیست شناسی مولکولی یافته است. با این‌حال، پایداری حرارتی پایین، عدد تبدیل کم و تمایل شدید لوسیفراز به ATP موجب محدودیت در استفاده از سیستم‌های مبتنی بر لوسیفراز در کاربردهای تجاری شده است. استفاده از حلال‌های بسازودگداز روشی نوین جهت پایدارسازی پروتئینها و کاتالیزورهای زیستی است. یک گروه از حلال‌های بسازودگداز عموماً شامل یک نمک ارگانیک و گروه‌های دهنده هیدروژن می‌باشند که در نتیجه آن پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌شوند. در این مطالعه، اثرات این حلال‌ها بر ویژگی های سینتیکی آنزیم لوسیفراز *Lampyris turkestanicus* وحشی و جهش‌یافته ($E^{354}R/Arg^{356}$) در حضور کولین‌کلراید: گلیسرول با نسبت مولی ۱:۲ به عنوان حلال بسازودگداز بررسی شد. بدین منظور، هر دو آنزیم وحشی و جهش‌یافته در باکتری اشزیشیاکلی سویه BL21 بیان گردید و پروتئین مورد نظر از طریق کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و برای مطالعات سینتیکی استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، حلال بسازودگداز باعث افزایش پایداری دمایی لوسیفرازهای وحشی و جهش‌یافته E354R/Arg356 شد.

واژه های کلیدی: بیولومینسانس، لوسیفراز، حلال های بسازودگداز، پایداری دمایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی: Saman_h@modares.ac.ir

مقدمه

بیوشیمی سیستم بیولومینسانس حشره‌ی شبتاب، شناخته‌شده‌ترین نمونه در میان سایر اشکال خشکی‌زی آن است (۱۱). این سیستم شامل ترکیب بنزوتیازولی لوسیفرین، آنزیم لوسیفراز، و فعال‌سازی توسط ATP می‌باشد (۳، ۶ و ۱۹). لوسیفراز حشره شبتاب تولید بیولومینسانس را از طریق دو واکنش آنزیمی کاتالیز می‌کند. در مرحله ی اول، فعال‌سازی لوسیفرین از طریق استری شدن گروه آدنوزین منوفسفات متعلق به ATP و با انتقال گروه کربوکسیل لوسیفرین و آزادسازی پیروفسفات انجام می شود. در مرحله بعد، شکل فعال‌شده لوسیفرین، لوسیفریل آدنیلات، به کمک اکسیژن مولکولی اکسید شده و حدواسط پراکسی حلقوی غنی از انرژی را ایجاد می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

این حدواسط با شکست خودبخودی، به co_2 و اکسی لوسیفرین برانگیخته تبدیل می شود که ترکیب اکسی لوسیفرین برانگیخته با تبدیل به حالت پایه به نشر یک فوتون نور مرئی با راندمان کوانتومی قابل توجه (٪۶۰-٪۴۵) منتهی می گردد (۴، ۶ و ۱۰).

با توجه به ویژگی‌های مختلف آنزیم لوسیفراز از جمله نشر نور مرئی، سیگنال پس زمینه‌ی بسیار پایین، راندمان کاتالیتیک بالا، اختصاصیت برای سوبسترا، حساسیت بالا برای ATP ، این آنزیم ابزار قدرتمندی در مطالعات مختلف *in vitro* و *in vivo* می باشد. از جمله این کابردها می توان به سنجش‌های وابسته به ATP، تخمین آلودگی‌های باکتریایی، فرایندهای تصویربرداری مولکولی، و سیستم های گزارشگر ژنتیکی و پروتئینی اشاره کرد (۱۸). شایان ذکر است که این آنزیم به عنوان حسگر مولکولی به منظور آشکارسازی میانکنش های پروتئین-پروتئین و آنالیت های مختلف نیز ابزاری کارآمد است (۱۳ و ۱۷). با این وجود، استفاده از لوسیفراز نوع وحشی اغلب به دلیل پایداری ناکافی این آنزیم در دماهای بیش از ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد، محدود می‌شود(۱۰ و ۱۵). بنابراین فراهم کردن اشکال پایدار حرارتی لوسیفراز اغلب مورد نیاز می باشد. لذا تلاش های بسیاری در زمینه‌ی اعمال جهش‌های مختلف به منظور افزایش پایداری حرارتی و بهینه کردن سایر خواص آن انجام شده است. در کنار استفاده از روش‌های جهش‌زایی هدفمند (۱ و ۷)، استفاده از حلال‌های مختلف به منظور ارتقای خواص آنزیمی از جمله پایداری حرارتی و راندمان کاتالیتیک آنزیم نیز از جمله روش های مرسوم می باشد (۵ و ۱۲).

حلال های بسازودگداز(deep eutectic solvents) به عنوان گروه ویژه‌ای از حلال‌های یونی و به منظور رفع نقایص حلال‌ها (سمیت و پر هزینه بودن)، در اوایل قرن حاضر معرفی شدند و در سال‌های اخیر به عنوان حلال‌های سبز در حوزه صنعت و پژوهش بسیار مور توجه قرار گرفتند (۲۰). یک حلال بسازودگداز در واقع نوعی حلال یونی است که عموما متشکل از دو یا سه جز ارزان با قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی در بین اجزای تشکیل دهنده می‌باشدکه منجر به تشکیل مخلوط زودگداز می‌شوند. به طوریکه حلال بسازودگداز که در نهایت ایجاد می شود نقطه ذوب کمتری از تک تک عناصر تشکیل‌دهنده اولیه خود خواهد دشت. عموما حلال‌های بسازودگداز با کاهش بسیار شدید در نقطه انجمادشان شناخته می شوند به طوریکه در دماهای کمتر از ۱۵۰°C مایع اند. شایان توجه است که اغلب آنها در بازه دمایی دمای اتاق تا ۷۰°C مایع اند (۲۱). حلال های eutectic در چهار گروه طبقه بندی می شوند:

گروه ۱ که از مخلوط یک نمک فلزی و یک نمک آلی ساخته می شود، گروه ۲ که از مخلوط هیدرات نمک فلزی و نمک آلی تشکیل می شود، گروه ۳ که از مخلوط یک گروه پیوند هیدروژنی دهنده و یک نمک آلی تشکیل می شود، و گروه ۴ که از مخلوط (هیدرات) نمک فلز و یک گروه پیوند هیدروژنی دهنده ساخته می شود (۲۰).

پیشینه استفاده از حلال‌های بسازودگداز در واکنش‌های آنزیمی برای اولین بار به کار Gorke و همکارانش در سال ۲۰۰۸ برمی گردد (۵). در این کار تبدیلات زیستی کاتالیز شده توسط آنزیم هیدرولاز در حضور حلال بسازودگداز ها بررسی شد. پس از آن در سال ۲۰۱۰ Widersten و همکارانش تاثیر به کارگیری حلال بسازودگداز را بر عملکرد آنزیم اپوکسیدهیدرولاز بررسی کردند. در سال ۲۰۱۱ در کار Hua Zhao و همکارانش عملکرد آنزیم لیپاز در حلال‌های بسازودگداز گلیسرولی بررسی شد (۹). با توجه به مزایای این حلال‌ها نسبت به نسل قبلی حلال‌های یونی، از جمله تهیه‌ی آسان، زیست تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، عدم سمیت، و ...، و از سوی دیگر، توانایی این حلال‌ها در جهت بهینه سازی خواص سینتیکی و ساختاری آنزیم‌ها، در بررسی حاضر، پتانسیل کارامدی

Archive of SID

www.SID.ir

یک نمونه از گروه ۳ این خانواده از حلال‌ها برای بهینه‌سازی کاتالیز آنزیمی آنزیم لوسیفراز انتخاب شد. حلال بسازودگداز انتخابی کولین کلراید: گلیسرول به نسبت مولی ۲:۱ بود که پس از تهیه به عنوان محیط کاتالیز آنزیمی آنزیم لوسیفراز متعلق به گونه *Lampyris turkestanicus*، در دو شکل وحشی و جهش یافته ($E^{354}R/Arg^{356}$)، به کار رفت (۸). نمونه جهش‌یافته، به دلیل تفاوت در محتوای آرژینین سطحی خود، امکان بررسی تاثیر حضور آمینواسیدهای باردار سطحی را میسر می سازد. برای این منظور ابتدا رقت بهینه (جهت سنجش آنزیمی) حلال بسازود گداز تهیه شد و در ادامه متغیر های سینتیکی همچون روند فعالیت آنزیم علیه زمان، دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیمی، پایداری حرارتی، و فعالیت باقیمانده آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. حضور این حلال در محیط کاتالیز آنزیمی منجر به افزایش پایداری حرارتی، تغییر دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم، و تغییر در الگوی تنزل وابسته به زمان نور حاصل از واکنش آنزیمی شد.

مواد و روشها

مواد: D-Luciferin (Resem BV -The Netherlands) potassium salt، مواد محیط کشت (Sigma)،

ATP (Roche)، IPTG و کانامایسین از (Sigma)، ستون Ni-NTA Sepharose (Novagene) و pET28a (+) (Novagene).

دستگاه‌ها: Luminometer (Berthold)، UV-Visible Spectrophotometer (Varian)

بیان، تخلیص و سنجش غلظت پروتئینها: به منظور انجام سنجش های آنزیمی، نیاز به بیان بالای آنزیم‌ها و خالص-سازی آنها می‌باشد.پس از القای ژن لوسیفراز مورد نظر و القای ژن آنزیم جهت بیان بالای آن، به منظورتخلیص آنزیم های مورد نظر از روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل سفارز)استفاده شد. آنزیم‌های نوترکیب بیان شده دارای دنبالهٔ هیستیدینی (His_6-tag) درانتهای آمین-N (N-Terminal) خود می‌باشند. در ادامه برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) استفاده شد. بافر جدا کننده (Elution Buffer) حاوی ۳۰۰ mM NaCl، ۲۵۰ mM Imidazole، Tris/HCl ۵۰ mM با pH ۷/۸ 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 تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد و سپس جهت سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورداستفاده شد و در هر مورد با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه های آنزیمی مشخص شد (۱۹).

تهیه حلال بسازودگداز: حلال منتخب در این مطالعه کولین کلراید:گلیسرول به نسبت مولی ۱:۲ بود. با توجه به وزن مولی گلیسرول ((g/mol) ۹۲,۰۲)و کولین کلراید ((g/mol) ۱۳۹,۶۲)و با در نظر گرفتن نسبت مولی به کار رفته از گلیسرول،۲ مول معادل ۱۸۴,۰۴ گرم، و از کولین کلراید معادل ۱ مول، ۱۳۹,۶۲ گرم، در سنتز این حلال استفاده شد. البته در نهایت به منظور سنتز در حجم های مختلف با رعایت نسبت ذکر شده از مقادیر متفاوت این دو ترکیب استفاده شد. در ادامه به منظور سنتز حلال بسازودگداز می بایست 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 ^{o}C ۷۰ و برای مدت زمان تقریبی ۶۰ دقیقه استیر شده تا نهایتا مایع شفافی که همان حلال بسازودگداز است حاصل شود.

تعیین رقت بهینه از حلال بسازودگداز: تعیین رقت بهینه از حلال بسازودگداز به منظور انجام سایر سنجش های

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیمی ضروری است. رقت‌های نهایی از حلال بسازودگداز به صورت درصد حجمی به حجمی از حلال نسبت به کل حجم سنجش و در مقادیر (۸۰٪،۷۰٪،...،۲۰٪،۱۰٪،۵٪) آماده شد و فعالیت ۵ میکرولیتر از آنزیم لوسیفراز در حضور ۲۵ میکرولیتر از کمپلکس سوبسترا (۱mMLuciferin، ۲ mM ATP، mM ۵ Mg^{2+} و ۵۰ mM Tris/HCl) و ۲۰ میکرولیتر از هر یک از رقت های تهیه شده از حلال بسازودگداز مورد بررسی قرار گرفت.در مقابل، فعالیت هر دو آنزیم در حضور ۲۰ میکرولیتر از بافر تریس ۵۰ mM (به عنوان کنترل منفی) بررسی شد و پس از مقایسه نتایج، رقت بهینه حلال بسا زودگداز در حجم نهایی سنجش آنزیمی تعیین گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم علیه زمان: فعالیت آنزیم با افزودن ۵ میکرولیتر از آنزیم به ۲۵ میکرولیتر از کمپلکس سوبسترا و ۲۰ میکرولیتر از حلال بسازود گداز در رقت بهینه به عنوان کنترل مثبت وبار دیگر ۲۰ میکرولیتر از بافر تریس به عنوان کنترل منفی در بازه ی زمانی ۳۹۰ ثانیه و با فواصل هر ۳۰ ثانیه یکبار به کمک دستگاه لومینومتر قرار گرفت.

بررسی دمای بهینه آنزیم وحشی و جهش یافته: به منظور تعیین دمای بهینه ی آنزیم ابتدا ۲۰ میکرولیتر از حلال، ۲۵ میکرولیتر از از کمپلکس سوبسترا به مدت ۵ دقیقه در دامنه ی دمایی ۴۰-۵ (با فواصل ۵ دقیقه‌ای) انکوبه شدو سپس بلافاصله با افزودن ۵ میکرولیتر آنزیم فعالیت آنزیمی به کمک دستگاه لومینومتر اندازه گیری شد.به همین ترتیب فعالیت آنزیم در حضور بافر تریس نیز اندازه گیری و مورد مقایسه قرار گرفت.

اندازه گیری غیر فعال شدن و پایداری حرارتی آنزیم: به منظور بررسی پایداری حرارتی، هر آنزیم با غلظت ۰/۰۲ mg/ml در دامنه دمایی ۵۰-۲۰ (با فواصل ۵ درجه‌ای) یکبار در حضور بافر تریس و بار دیگر درحضور حلال به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس فعالیت باقیمانده پس از ۲ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و افزودن ۲۵ میکرولیتر از کمپلکس سوبسترا توسط دستگاه لومینومتر اندازه گیری شد. غیر فعال شدن حرارتی نیز به همین ترتیب و البته در دمای ثابت ^{o}C ۳۰ و در عوض در دامنه زمانی ۵۰-۰ با فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای انجام گرفت. فعالیت باقیمانده آنزیم به صورت درصد فعالیت اولیه گزارش شد.

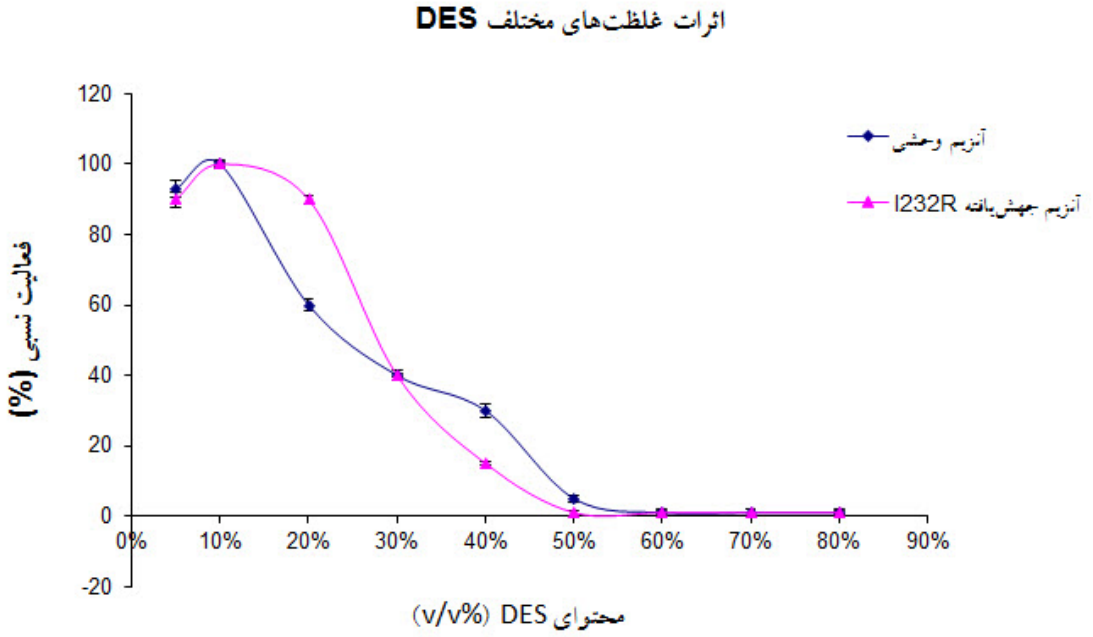
نتایج

پس از القای ژن آنزیم جهت بیان بالای آن و تخلیص آنزیم های مورد نظر به روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل سفارز) و تأیید حضور و خلوص نمونه-ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE و غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد مشخص شد .در ادامه پس از سنتز حلال بسازودگداز کولین کلراید:گلیسرول به نسبت مولی ۱:۲، می‌بایست پیش از انجام سنجش‌های آنزیمی بعدی، رقت بهینه‌ی حلال را در اختیار داشت، تا سنجش‌ها در شرایط بهینه از نسبت مناسب حلال به حجم کلی سنجش انجام شوند.

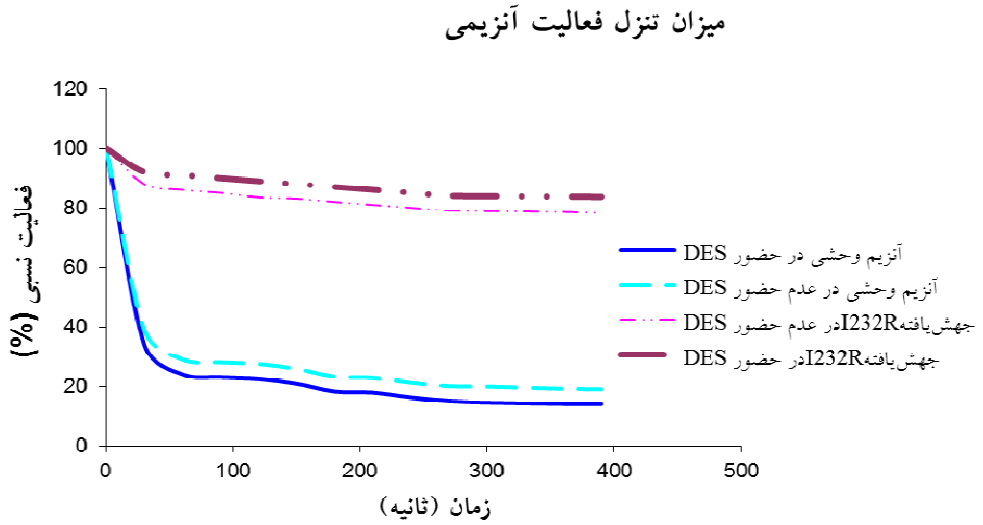
رقت بهینه از حلال بسازودگداز: سنجش آنزیمی در رقت‌های نهایی از حلال بسازودگداز به صورت درصد حجمی به حجمی از حلال بسازود گداز نسبت به کل حجم سنجش و درمقادیر(۸۰٪،۷۰٪،...،۲۰٪،۱۰٪،۵٪) انجام شدو مشخص شدکه میزان فعالیت آنزیمی با افزایش غلظت حلال و متعاقباً افزایش گران‌روی آن، کاهش می یابد. به طوریکه بهترین رقت در این بین، رقت ۱۰٪ در حجم نهایی سنجش آنزیم لوسیفراز بود، لذا این رقت از حلال به عنوان نسبت بهینه برای سایر بررسی ها مورد استفاده قرار گرفت (شکل۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نمودار فعالیت نسبی آنزیم لوسیفراز وحشی و جهش‌یافته آنزیم جهش یافته ی $I^{232}R$ -$E^{354}R/Arg^{356}$ در غلظت‌های مختلف DES.
آنزیم جهش یافته ی $I^{232}R$ -$E^{354}R/Arg^{356}$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.



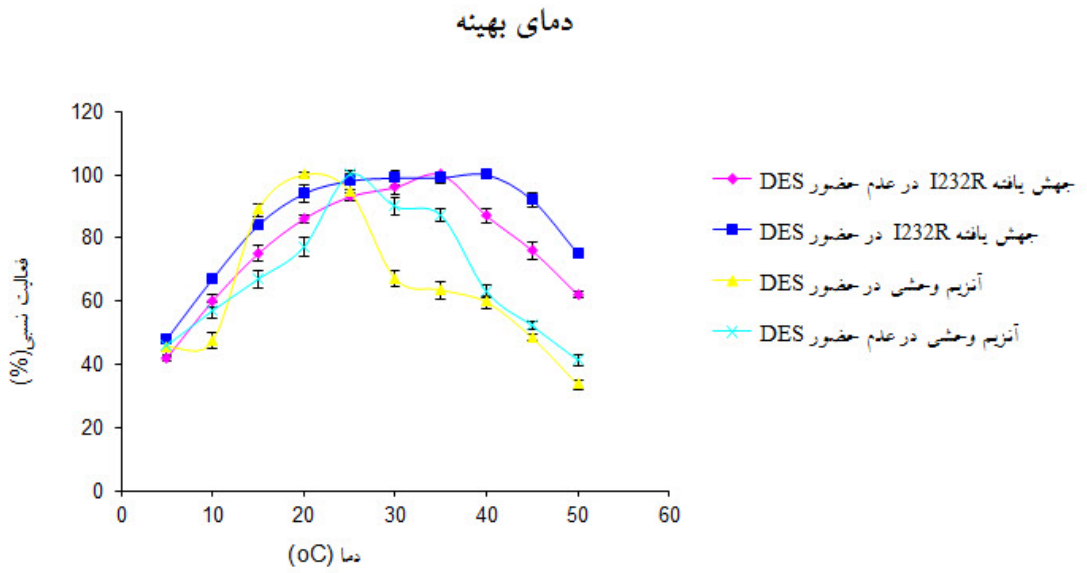
شکل۲- نمودار میزان تنزل فعالیت آنزیم. در این نمودار فعالیت آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته $I^{232}R$ -$E^{354}R/Arg^{356}$ در زمان‌های مختلف در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته ی $I^{232}R$ -$E^{354}R/Arg^{356}$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

فعالیت آنزیم علیه زمان: بررسی فعالیت آنزیم علیه زمان در حضور حلال و بافر برای هر دو نمونه ی آنزیمی لوسیفراز وحشی و جهش یافته نشان داد که نرخ کاهش فعالیت آنزیمی در حضور حلال بسازودگداز برای آنزیم جهش یافته کاهش یافته در صورتیکه در مورد آنزیم وحشی نرخ کاهش فعالیت در حضور حلال اندکی افزایش یافته است. (شکل۲).

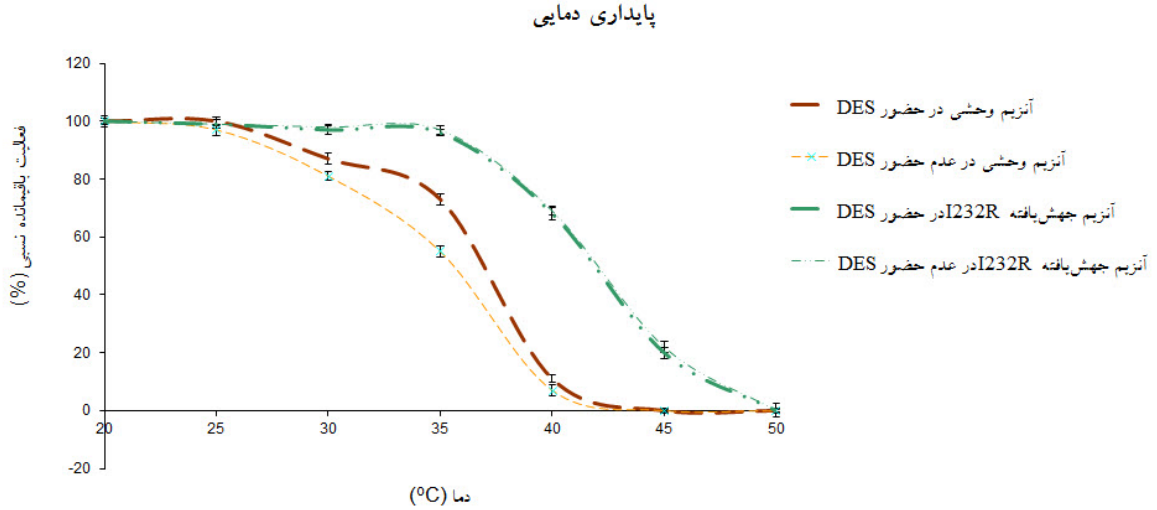
دمای بهینه آنزیم وحشی و جهش یافته: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دمای بهینه‌ی آنزیم وحشی در حضور حلال، نسبت به دمای بهینه‌ی فعالیت در عدم

www.SID.ir

حضور آن 5^oC کاهش یافته، حال آنکه دمای بهینه‌ی فعالیت برای جهش یافته‌ی $E^{354}R/Arg^{356}$ حضور حلال، نسبت به دمای بهینه‌ی فعالیت در عدم حضور آن 5^oC افزایش داشت (شکل ۳).



شکل ۳- دمای بهینه آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته $I^{232}R$ - $E^{354}R/Arg^{356}$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته ی $I^{232}R$ - $E^{354}R/Arg^{356}$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

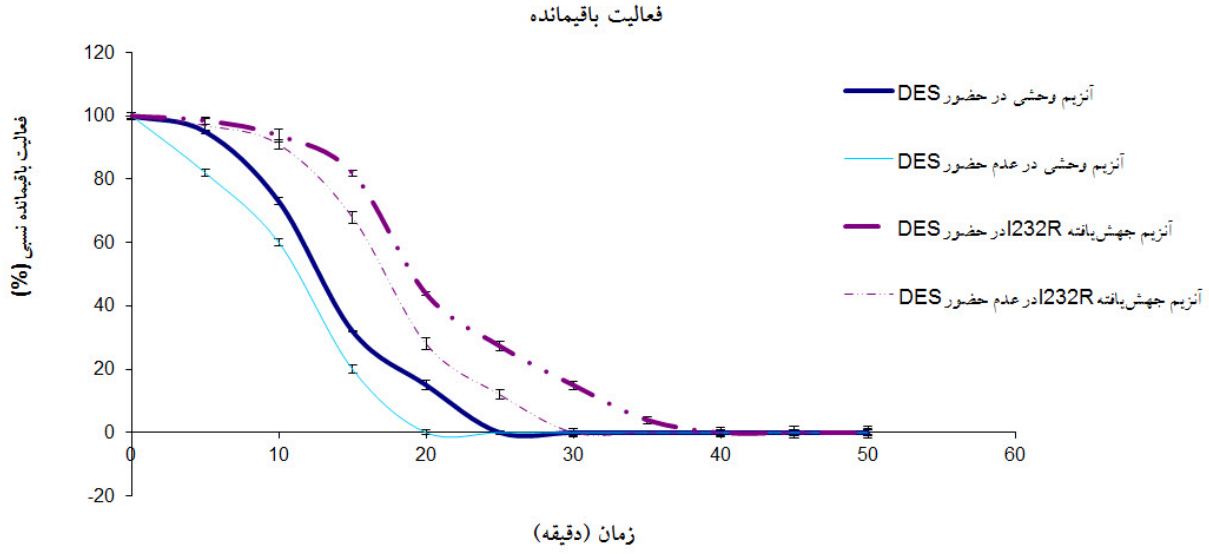


شکل ۴- پایداری دمایی آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته $I^{232}R$ - $E^{354}R/Arg^{356}$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته ی $I^{232}R$ - $E^{354}R/Arg^{356}$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

غیر فعال شدن و پایداری حرارتی آنزیم: با رسم نمودارهای مربوط به غیرفعال شدن و پایداری حرارتی انزیم، می توان دریافت که در حضور حلال، آنزیم لوسیفراز وحشی و جهش یافته $E^{354}R/Arg^{356}$، در حضور حلال نسبت به محیط کاتالیز محتوی تریس، پایداری بیشتری کسب کرده است(شکل ۴). میزان غیر فعال شدن حرارتی هر دو آنزیم (جهش یافته ی $E^{354}R/Arg^{356}$و آنزیم لوسیفراز وحشی) در حضور حلال نسبت به محیط کاتالیز

www.SID.ir

محتوی تریس با کاهش همراه بود، به عبارت دیگر، فعالیت باقیمانده‌ی آنزیمی با گذشت زمان در حضور حلال نسبت به محیط کاتالیز محتوی تریس بیشتر بود (شکل۵).



شکل ۵- فعالیت باقیمانده آنزیم‌های وحشی و جهش‌یافته $I^{232}R$ - $E^{354}R/Arg^{356}$ در حضور و عدم حضور حلال DES. آنزیم جهش یافته ی $E^{354}R/Arg^{356}$ - $I^{232}R$ در شکل به اختصار $I^{232}R$ نوشته شده است.

بررسی نمودارهای پایداری حرارتی آنزیم‌های جهش‌یافته و وحشی (پس از انکوباسیون در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه)، مبین افزایش پایداری حرارتی هر دو آنزیم، در حضور حلال، نسبت به عدم حضور آن می باشد. به طوریکه در حضور حلال، در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد فعالیت باقیمانده‌ی نسبی آنزیم وحشی حدود ٪۷۳، و در عدم حضور حلال حدود ٪۵۵ بود، در نمونه‌ی آنزیمی جهش‌یافته در دمای ۴۰ درجه، فعالیت باقیمانده‌ی نسبی حدود ، ٪۷۰ و در حضور حلال حدود ٪۹۰ فعالیت اولیه بود. در ارتباط با فعالیت باقیمانده آنزیم وحشی مشاهده شد که در عدم حضور حلال پس از ۲۰ دقیقه، فعالیت نسبی به صفر رسیده حال آنکه با گذشت همین مدت زمان در حضور حلال ٪۱۵ فعالیت اولیه‌ی آنزیم باقی ماند. به علاوه، در مورد نمونه جهش‌یافته ، پس از ۲۵، باقیمانده فعالیت آنزیمی در حضور حلال، قریب به دو برابر این مقدار در حضور بافر تریس می باشد.

بحث

در مقایسه با حلال های یونی، حلال‌های بسازودگداز دارای مزایای متعددی می‌باشند که از جمله می‌توان به کم هزینه بودن، خنثی بودن (از نظر شیمیایی نسبت به آب)، تهیه آسان، زیست تخریب پذیری، سازگاری با محیط زیست، و نداشتن سمیت اشاره کرد (۲۰) و از آنجایی که در مبحث کاتالیز آنزیمی انتخاب حلال کم هزینه و ایمن بسیار حائز اهمیت است به کارگیری حلال های بسازودگداز در حیطه پژوهش و صنعت بسیار مورد توجه است. با توجه به کاربردهای متعدد آنزیم لوسیفراز در حوزه های مختلف (۱۶)، بهینه سازی خواص فیزیکوشیمیایی این آنزیم از اهمیت بسزایی برخوردار است. لازم به ذکر است که آنزیم لوسیفراز همانند بیشتر آنزیم‌های مزوفیل، دارای پایداری اندکی در محیط‌های در شیشه (*in vitro*) و در موجود زنده (*in vivo*) می‌باشد (۲). لذا کاربردهای لوسیفراز در تشخیص های کلینیکی و کیت-های تشخیص آلودگی‌های میکروبی به خاطر پایداری بسیار پایین این آنزیم محدود شده است، که این ویژگی مسلماً باعث کاهش حساسیت و دقت کاربردهای آنالیتیکال

Archive of SID

www.SID.ir

لوسیفراز گردیده است. بنابراین به منظور توسعه کارکردهای تجاری و علمی این تکنولوژی، نیاز به بهبود خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم لوسیفراز می‌باشد. با در نظر گرفتن این نکات و با توجه به خواص ذکر شده برای حلال های بسازودگداز و امکان اعمال تغییر خواص مختلف آنزیمی از جمله خواص سینتیکی و ساختاری، مقایسه پارامترهای مختلف آنزیمی(طبیعی و جهش‌یافته‌ها) در حضور و عدم حضور این حلال ها حائز اهمیت بوده و مزایا و محدودیت های به کارگیری چنین حلال‌هایی را آشکار می‌سازد.

با در نظر گرفتن این نکات و با توجه به پیشینه‌ی استفاده از این حلال‌ها در کاتالیز آنزیمی، ترکیب بسازودگداز کولین کلراید: گلیسرول به نسبت مولی ۱:۲ جهت استفاده در محیط کاتالیز آنزیمی انتخاب شد. ضمنا با توجه به لزوم در اختیار داشتن رقت بهینه ی حلال لازم بود پیش از انجام سنجش های آنزیمی بعدی، رقت بهینه‌ی حلال تعیین شود، نتیجتا با بررسی مقادیر (v/v%)(۸۰٪،۷۰٪،...،۲۰٪،۱۰٪،۵٪) مشخص شد که میزان فعالیت آنزیمی با افزایش غلظت حلال و متعاقبا افزایش گرانروی آن، کاهش می یابد. به طوریکه بهترین رقت در این بین، رقت ۱۰٪ در حجم نهایی سنجش آنزیم لوسیفراز بود. در این خصوص می توان اذعان داشت که کاهش فعالیت آنزیمی در غلظت‌های بالاتر حلال، پدیده‌ای مستقل از اثر حلال بر دناتوره شدن پروتئین بوده (۱۲) و در عوض این امر مرهون کاهش شانس برخورد موثر آنزیم و سوبسترا در غلظت‌های بالای حلال و ویسکوزیته‌ی زیاد آن می باشد. از سوی دیگر، این حلال‌ها ممکن است بر کمپلکس‌های حدواسط واکنش یا آنزیم-سوبسترا تاثیر ناپایدار کنندگی 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 (Decay rate). مرحله افزایش سریع مربوط به اشباع شدن آنزیم از سوبسترا (لوسیفرین و ATP) و مرحله کاهش فعالیت به علت اثر بازدارندگی محصول جانبی دی‌هیدرولوسیفرین می‌باشد. نتایج این بررسی نشان داد که سرعت مرحله کاهشی در مورد آنزیم جهش‌یافته در حضور حلال کاهش یافته است. از آنجایی که کاهش نور مربوط به اثر بازدارندگی محصول جانبی واکنش است، می‌بایست احتمالا حلال بسازودگداز با کند کردن روند تخریب این حدواسط، این روند را کاهش می دهد.

به منظور مطالعه اثر حلال بر تغییرات درجه حرارت بهینه آنزیم جهش یافته و وحشی، نمودار درجه حرارت بهینه در محدوده دمایی ۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسم گردید. نتایج حاصله نشان می‌دهد که دمای بهینه آنزیم جهش‌یافته‌ی $E^{354}R/Arg^{356}$ در حضور حلال نسبت به بافر تریس 5^oC افزایش داشت، در مقابل آنزیم وحشی در حضور حلال 5^oC کاهش داشت. این نحوه‌ی اثر گذاری حلال احتمالا ناشی از تغییر در محتوای ساختار دوم آنزیم می باشد.

نتایج نشان می‌دهد انکوباسیون هر دو آنزیم در حضور حلال، منجر به پایدارتر شدن آنزیم نسبت به محیط واکنش بافری می شود. به عنوان یک توصیف احتمالی در افزایش پایداری حرارتی می توان به فشرده‌تر شدن ساختار در حضور این حلال اشاره کرد، که نتیجتا از دناتوره شدن حرارتی آنزیم ممانعت می کند. در ضمن به دلیل قابلیت این حلال در برقراری پیوند های هیدروژنی با آنزیم در محیط واکنش، این حلال قادر خواهد بود تغییرات ساختاری در آنزیم لوسیفراز اعمال کند.

در نهایت اینکه، گرچه حلال بسازودگداز به کار رفته، محتوی یون‌های دناتوره کننده همچون کلراید می‌باشد، اما غلظت‌های مولی یون‌های سازنده‌ی حلال به میزان قابل توجهی به واسطه‌ی حضور گلیسرول، به عنوان معادل‌های مولی این یون‌ها، کاهش می‌یابد. در واقع گلیسرول دارای

Archive of SID

www.SID.ir

قابلیت برقراری پیوند هیدروژنی با این یون ها بوده، و از طرف دیگر این قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی، در مواجهه با ریشه های سطحی پروتئین، احتمالا منجر به پایدار شدن ساختار آن خواهد شد.

منابع

1. Branchini B. R. MRA, Murtishaw M. H., Anderson S. M. and Zimmer M. (1998) Site-directed mutagenesis of Histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site. Biochemistry 37: 15311-15319.
2. DeLuca M, McElroy WD (1974) Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. Biochemistry 13: 921-925.
3. Desjardin D, Oliveira A.G., Stevani C.V. (2008) Fungi Bioluminescence Revisited. Photochem Photobiol Sci 7: 170.
4. Ghirandella H (1998) The anatomy of light production: the fine structure of the firefly lantern. Microscopic anatomy of invertebrates 11: 363-381.
5. Gorke JT, Srienc F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. Chemical Communications: 1235-1237.
6. H. BEJ (1988) Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects. Adv Oxygen Process 1: 123-178.
7. Hosseinkhani AR-MaS (2009) Design and characterization of novel trypsin-resistant firefly luciferases by site-directed mutagenesis. Protein Engineering, Design & Selection 22: 655–663.
8. Hosseinkhani MMaS (2011) Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops. Protein Engineering, Design & Selection 24: 893-903.
9. Hua Zhao GABaSH (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. Org Biomol Chem 9: 1908-1916.
10. Inouye S (2010) Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. Cellular and molecular life sciences 67: 387-404.
11. Lall B. A. SHH, Biggley W. H. and Lloyd J. E. (1980) Ecology of colors of firefly bioluminescence. Science 225: 512-514.
12. Lindberg D, de la Fuente Revenga M, Widersten M (2010) Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. Journal of biotechnology 147: 169-171.
13. Masoud Torkzadeh-Mahani FA, Maryam Nikkhah, Saman Hosseinkhani (2012) Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis. Biosensors and Bioelectronics 38: 362-368.
14. MM. B (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 7: 248-254.
15. Moradi A, Hosseinkhani S Fau - Naderi-Manesh H, Naderi-Manesh H Fau - Sadeghizadeh M, Sadeghizadeh M Fau - Alipour BS, Alipour BS (2009) Effect of charge distribution in a flexible loop on the bioluminescence color of firefly luciferases. Biochemistry 48: 575-582.
16. Roda A, Pasini P Fau - Mirasoli M, Mirasoli M Fau - Michelini E, Michelini E Fau - Guardigli M, Guardigli M (2004) Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol 22: 295-303.
17. Taha Azad AT, Saman Hosseinkhani (2014) Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406: 5541-5560.
18. Tu SC (2007) Bacterial Luciferases. In "Luciferases and Fluorescent Proteins: Principles and advances in Biotechnology and Bioimaging". Transworld Research Network, Kerala, India: 1-18.
19. W. WTaHJ (1998) Bioluminescence. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 197-230.
20. Zhang Q, Vigier KDO, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews 41: 7108-7146.
21. Zhao H, Baker GA, Holmes S (2011) Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 72: 163-167.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigating the effects of Choline-based Deep Eutectic Solvent on bioluminescent reaction of wild type and Arg-rich mutant luciferase

Rahmati F.[1], Tashakor A.[2], Hosseinkhani S.[1] and Heydari A.[1]

[1] **Biochemistry Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Biochemistry Dept., Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Deep eutectic solvents (DES) are significantly important in enzymatic reactions. These solvents increase the efficient contact between substrate and enzyme and therefore, may increase enzyme stability and activity. Bioluminescence is the production and emission of light by a living organism. The principal chemical reaction in bioluminescence involves the light-emitting pigment luciferin and the enzyme luciferase. The enzyme catalyzes the oxidation of luciferin, which requires the energy-carrying molecule adenosine triphosphate (ATP). Because of its easily detectable product, luciferase has found a wide range of application in biotechnology and molecular biology. However, its low thermostability, low turnover number and high Km for ATP restrict further use of luciferase based systems in commercial application. Newly developed method which can be used to increase the stability of proteins and biocatalysts is to take advantage of Deep eutectic solvents (DESs). One group of Deep eutectic solvents are generally composed of organic salts with hydrogen bond donors, as a result of which hydrogen bonds are formed. In this study, we investigated the effects of these solvents on kinetic properties of wild type and $E^{354}R/Arg^{356}$ mutant *Lampyris turkestanicus* luciferases in the presence of choline chloride: glycerol with molar ratio of 2:1 as DES. For this, both wild type and mutant, expressed in *Escherichia coli* BL21, the protein of interest purified through affinity chromatography and used for kinetic studies. Based on the obtained results, DES has positive effect on the thermostability of wild type and mutant luciferases.

Key words: Bioluminescence, Luciferase, Deep eutectic solvents, thermostability

Archive of SID

www.SID.ir