

# عنوان: طراحی و ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر فتوپروتئین

## آکوئورین به منظور رصد یون کلسیم

میلاد امیری<sup>۱</sup>، امید طبائی<sup>۲</sup>، مهرناز ابراهیمی<sup>۲</sup>، هانیه جعفری<sup>۱</sup>، رضا حسن ساجدی<sup>۳</sup> و پرویز نوروزی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup>-دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تحقیقات تهران، ایران، تهران

<sup>۲</sup>-انستیتو الکتروشیمی دانشگاه تهران، ایران، تهران

<sup>۳</sup>-دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس، ایران، تهران



### چکیده

یون کلسیم در مسیرهای انتقال پیام، انقباض ماهیچه، فرایند لقای، آپوپتوز، متابولیسم سلولی و انعقاد خون نقش داشته و برای برخی از آنزیمها به عنوان کوفاکتور عمل می کند. با توجه به اهمیت این یون، رصد و دنبال کردن تغییرات غلظت و جریان آن در سلول و مایعات بیولوژیکی می تواند درک درستی از فیزیولوژی و عملکرد سلول در پاسخ به عوامل مختلف را ارائه دهد. همچنین در صنعت و مهندسی آب اندازه گیری یون کلسیم بسیار حائز اهمیت می باشد زیرا یکی از شاخص های سختی آب یون کلسیم می باشد. از این رو از روش های مختلفی برای اندازه گیری کلسیم از جمله روش رنگ سنجی، استفاده از پروب اختصاصی فلورسانس، نشر بیولومینسانس فتوپروتئین های وابسته به کلسیم و الکترو حساس به کلسیم (calcium ion-selective electrode) استفاده می شود. با توجه به اینکه فتوپروتئین آکوئورین در ساختار خود دارای ۴ موتیف EF-hand می باشد که ۳ تا از آنها جایگاه اتصال اختصاصی به یون کلسیم را فراهم می نمایند، Bioreceptor کلسیم در بیوسنسور مورد مطالعه ما می باشد. در این پژوهش توالی کدکننده فتوپروتئین آکوئورین در pET28a که از قبل کلون شده بود به روش شیمیایی به میزبان E. coli سویه (DE3 BL21) انتقال داده شد و بیان پروتئین با القای IPTG صورت گرفت و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص سازی و سپس دیالیز در غلظت بهینه EDTA انجام شد. به منظور ساخت بیوسنسور الکتروشیمیایی، الکتروود طلا به روش شیمیایی و اعمال ولتامتری چرخه ای تمیز شد. سپس به منظور تشکیل self-assemble monolayer (SAM) از مرکاپتوپروپیل تیوسید/مرکاپتودکانوئیک اسید (MUA/MPA) با نسبت حجمی (۷:۳) استفاده شد. برای فعال کردن گروه های کربوکسیلیک اسید مرحله ی قبل از واکنش N-3 دی متیل آمینو پروپیل اتیل کربو ایمید /N-هیدروکسی سوکسین ایمید به ترتیب با غلظت های ۰.۴ و ۰.۱ مولار به مدت ۱ ساعت استفاده شد و در ادامه مرحله تثبیت فتوپروتئین بر روی سطح الکتروود صورت گرفت. برای پوشش و انسداد نقاط فعال نشده از ۱% BSA استفاده گردید. تمامی مراحل کار با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه ای که تغییرات سطح الکتروود را نشان می دهد ضبط گردید. برای رصد کردن یون کلسیم از غلظت ۱ نانومولار CaCl<sub>2</sub> به روش لکه گذاری به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. کاهش پیک اکسید و احیا مربوط به ولتامتری چرخه ای نشان دهنده حس شدن و شناسایی زیستی یون کلسیم با این روش می باشد.

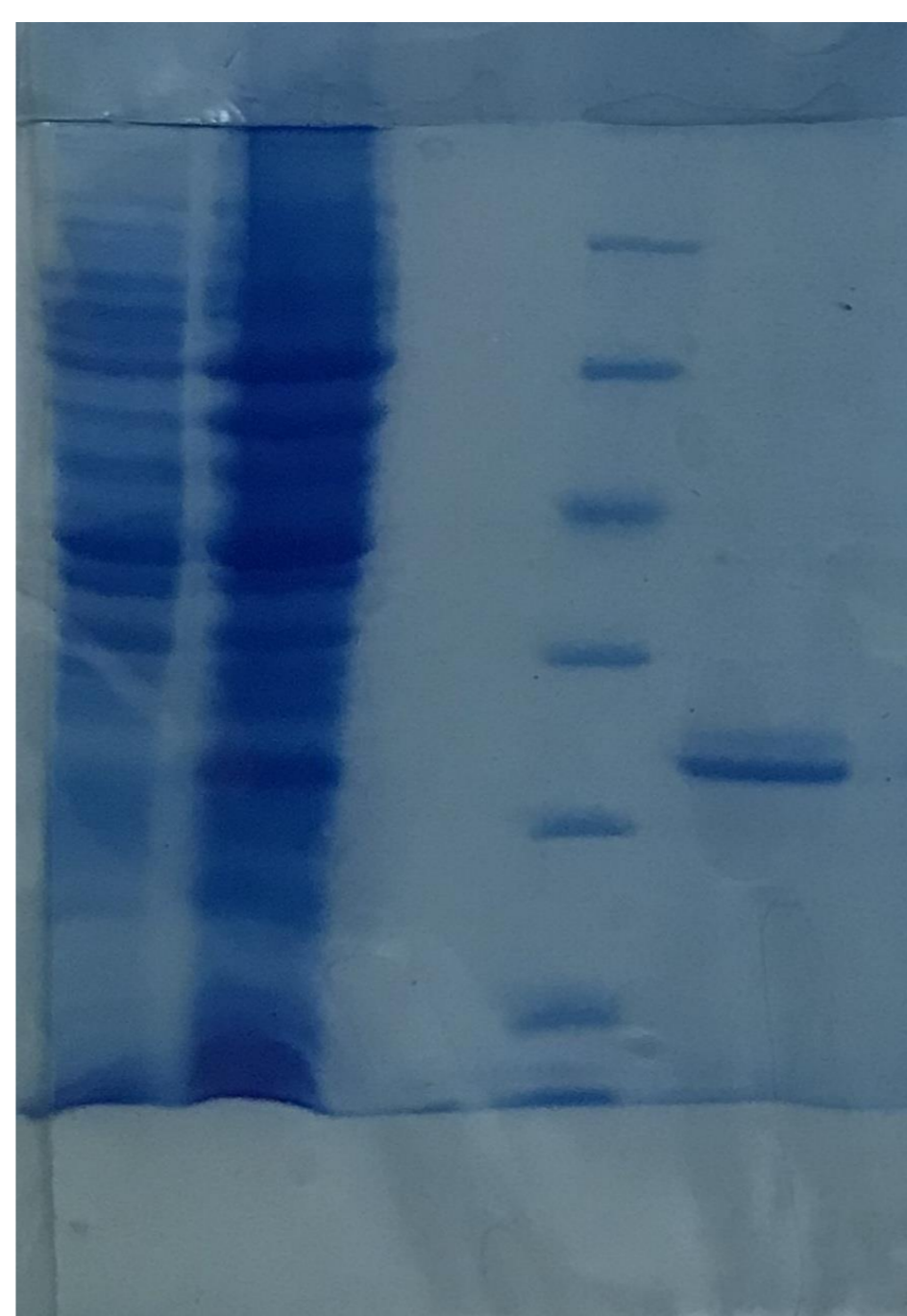
کلمات کلیدی: فتوپروتئین های وابسته به کلسیم، آکوئورین، بیوسنسور الکتروشیمیایی، ولتامتری چرخه ای

\* نویسنده مسئول: پرویز نوروزی. آدرس ایمیل: Pnorouzi@ut.ac.ir

## بحث و نتیجه گیری

طبق ولتاموگرام چرخه ای بدست آمده در محلول بافر فسفات ۱۰ میلی مولار حاوی نمک های پتاسیم کلرید با غلظت ۲۵۰ میلی مولار و نمک های K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] و K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] با غلظت ۵ میلی مولار در بازه پتانسیل -۰/۵ تا +۰/۸ ولت با سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت، در سطح الکتروود طلا تمیز به دلیل بالا بود انتشار زوج ردوکس آهن رفتار ولتاموگرام کاملا برگشت پذیر است. هرچند بعد از تشکیل تک لایه خود انباشته شده بر روی سطح الکتروود به دلیل ممانعت فضایی و دافعه الکتروستاتیک رفتار ولتاموگرام زوج ردوکس آهن برگشت ناپذیر میشود. پس از فعالسازی سطح توسط واکنشگرهای EDC و NHS و تشکیل استر فعال رفتار ولتاموگرام برگشت پذیر می شود هرچند جریان اکسید و احیاء آهن به دلیل ممانعت فضایی کمتر است. پس از لایه گذاری فتوپروتئین و BSA به دلیل اثر بازدارندگی لایه پروتئینی در انتشار زوج ردوکس آهن به سطح الکتروود جریان اکسید و احیاء زوج ردوکس کاهش می یابد که نشان دهنده ی تثبیت موفق آمیز پروتئین بر روی سطح می باشد. پس از قطره گذاری کلسیم کلرید با غلظت ۱ نانومولار به دلیل تشکیل کمپلکس جریان ولتامتری چرخه ای کاهش می یابد. و از این رو طراحی و ساخت زیست حسگر مبتنی بر الکتروشیمی بر پایه فرم آپوفتوپروتئین به صورت موفقیت آمیزی انجام شد و اندازه گیری کلسیم به صورت کیفی صورت گرفت.

## نتایج



از چپ به راست: BL21 منفی، عصاره بیان شده باکتری، مارکر پروتئینی، آکوئورین خالص شده

## مقدمه

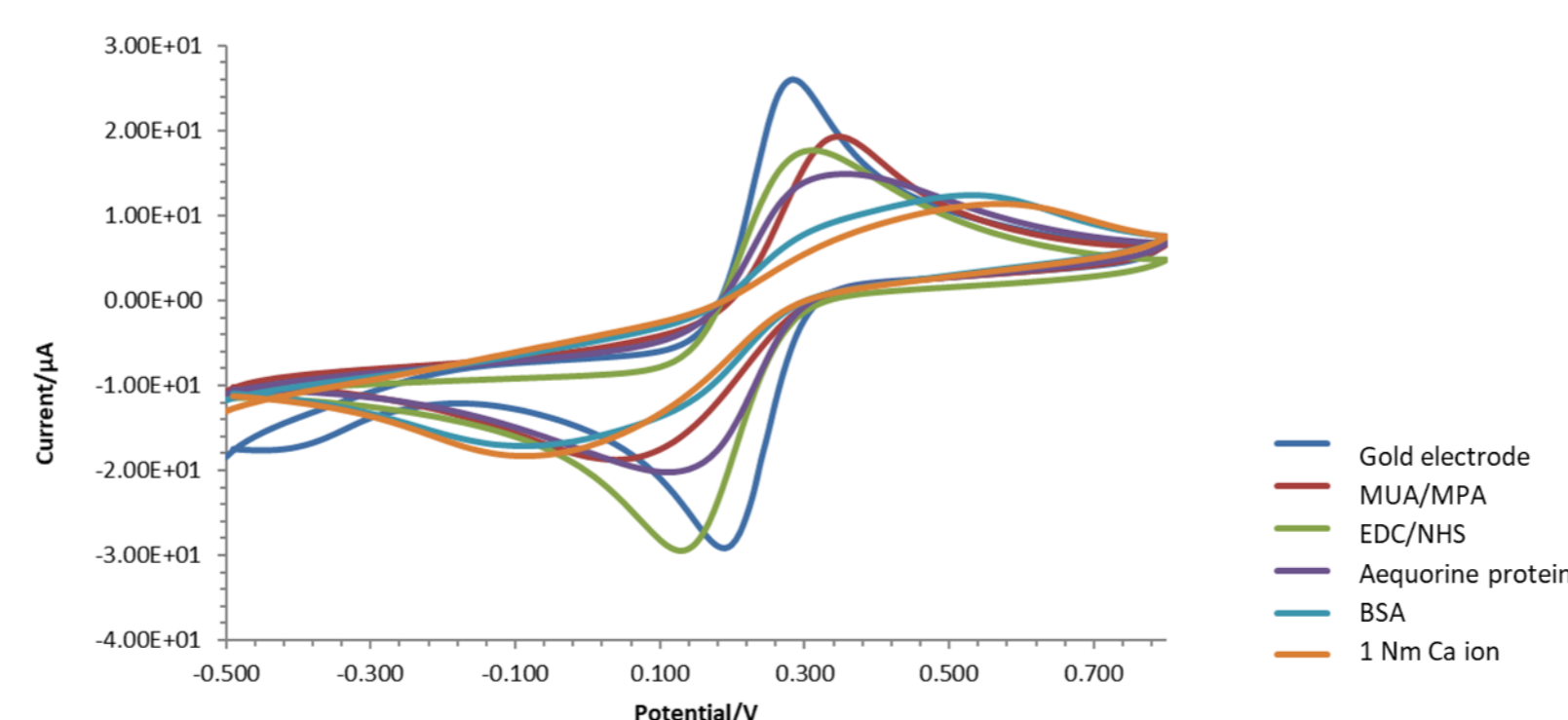
با توجه به این که کلسیم نقش بسیار مهمی در بدن دارد، از جمله استخوان سازی در کودکی و نوجوانی، تنظیم ضربان قلب، تاثیر در متابولیسم آهن، تنظیم کار سیستم اعصاب بدن، انتقال پیام های عصبی و انعقاد خون و غیره را ایفا می کند. ردیابی و اندازه گیری آن، چه در سلول و چه در مایعات بیولوژیکی از اهمیت بسیاری برخوردار می باشد. از آن جایی که فتوپروتئین هایی از قبیل آکوئورین، نیوپوسین، اولبلین، و... نسبت به غلظت های بسیار پایین کلسیم 10-100 nM حساس می باشند می توانند به اشکال مختلف زیست حسگر، یون کلسیم را ردیابی و مورد مطالعه قرار دهند. آنچه در این تحقیق مدنظر می باشد، حسگرهای زیستی است که در آن از فتوپروتئین حساس به یون کلسیم استفاده خواهد شد. فتوپروتئین های وابسته به کلسیم، جزء سیستم های بیولومینسانسی precharged می باشند که از طریق واحدهای ساختاری همولوگی به نام EF-hand، به طور انتخابی به کلسیم متصل می شوند. در این مطالعه از زیست حسگر الکتروشیمیایی بدون نیاز به نشان مبتنی بر فتوپروتئین آکوئورین جهت شناسایی و اندازه گیری کلسیم مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

در این پژوهش توالی کدکننده فتوپروتئین آکوئورین در pET28a که از قبل کلون شده بود به روش شیمیایی به میزبان E. coli سویه BL21 (DE3) انتقال داده شد و بیان پروتئین با القای IPTG صورت گرفت و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص سازی انجام شد سپس با استفاده از تکنیک SDS-PAGE میزان خلوص و اندازه پروتئین مشخص شد و با تکنیک برادفورد غلظت پروتئین اندازه گیری و دیالیز در غلظت بهینه EDTA به منظور حذف کلسیم اضافی انجام گردید. سپس به منظور ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی سپس به منظور ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی سطح الکتروود با ترکیبات مرکاپتان برای تک لایه های خود انباشته استفاده شد بعد از آن فتوپروتئین با کمک واکنش گرهای EDC/NHS با نسبت مولی ۱/۴ بر روی سطح الکتروود تثبیت گردید به منظور پوشش و انسداد نقاط فعال نشده از ۱% BSA، درصد استفاده شد و تمامی این تغییرات با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه ای ضبط گردید و سازه ی زیست حسگری مبتنی بر فتوپروتئین ساخته شد سپس به منظور رصد یون کلسیم از غلظت ۱ نانومولار CaCl<sub>2</sub> به روش لکه گذاری به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. کاهش پیک اکسید و احیا مربوط به ولتامتری چرخه ای نشان دهنده حس شدن و شناسایی زیستی یون کلسیم با این روش می باشد.

## منابع

- brahimi, Mehrnaz, et al. "Fabrication of a label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Candidatus Phytoplasma Aurantifolia." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 851 (2019): 113451.
- Haji-Hashemi, Hedieh, et al. "Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection." *Analytical biochemistry* 566 (2019): 102-106.
- Jalilian, Nezam, et al. "CdTe quantum dots with green fluorescence generated by bioluminescence resonance energy transfer from aequorin." *Microchimica Acta* 184.3 (2017): 753-762.
- Rahmani, Hossein, Fahimeh Ghavamipour, and Reza H. Sajedi. "Bioluminescence detection of superoxide anion using aequorin." *Analytical chemistry* 91.20 (2019): 12768-12774.



ولتاموگرام چرخه ای ثبت شده در محلول بافر فسفات ۱۰ میلی مولار حاوی نمک های پتاسیم کلرید با غلظت ۲۵۰ میلی مولار و نمک های K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] و K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] با غلظت ۵ میلی مولار در بازه پتانسیل -۰/۵ تا +۰/۸ ولت با سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت در طول مراحل ساخت زیست حسگر را نشان می دهد.