ششمین کنگره سراسری عناصر کمیاب ایران
تهران، دانشگاه تهران، ۶ الی ۸ اسفند ۱۳۹۸

انجمن عناصر کمیاب ایران

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات

بررسی حساسیت و اختصاصیت فتوپروتئین آکوئورین در شناسایی و اندازه‌گیری یون کلسیم

میلاد امیری[۱]، هانیه جعفری[۱]، پرویز نوروزی[۲] و رضا حسن ساجدی[۳،*]

[۱]-دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ایران، تهران
[۲]-انستیتو الکتروشیمی دانشگاه تهران، ایران، تهران
[۳]-دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس، ایران ، تهران

چکیده

با توجه به این که یون کلسیم در بسیاری از فرآیندهای زیستی مانند پیام‌رسانی و متابولیسم سلولی و فرآیندهای صنعتی از جمله مهندسی آب نقش مهمی ایفا می‌کند اندازه‌گیری آن حائز اهمیت بوده و بدین منظور روش های مختلفی مانند روش‌های رنگ‌سنجی و استفاده از پروب‌های حساس به کلسیم استفاده می‌شود. بیولومینسانس به عنوان یک فناوری کارامد جهت سنجش‌هایی با حساسیت و اختصاصیت بالا مورد توجه است. از بین سیستم‌های بیولومینسانسی، فتوپروتئین‌ها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود به آنالیزورهای بسیار عالی در مطالعات داخل و خارج سلولی تبدیل شده‌اند. در این مطالعه پس از بیان و تخلیص فتوپروتئین آکوئورین در *E. coli* سویه BL21 (DE3)، بهینه سازی غلظت و زمان انکوباسیون فتوپروتئین-سوبسترا (کلنترازین) با نسبت ۴/۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ۱۰۰ میکرومولار همچنین با نسبت حجمی ۲ به ۱ و زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. با توجه به این که آلودگی یون کلسیم محیط باعث خطا در اندازه‌گیری نمونه مورد نظر می‌شود، برای حذف آلودگی کلسیم از EDTA با غلظت بهینه شده (۰.۰۱) میلی مولار در بافر مربوط به انکوباسیون استفاده شد. سپس رفتار دوز- پاسخ آکوئورین نسبت به کلسیم در شریط فوق بدست آمد و با روش های آماری پارامتر هایی مثل EC50=0.2 mM و LOD=0.11mM و kd= 0.3mM محاسبه گردید. همچنین برای بررسی اختصاصیت فتوپروتئین آکوئورین در سنجش یون کلسیم، اثر نمک های کلرید فلزات مختلف شامل باریم، منگنز، منیزیوم،کادمیوم،کبالت، آلومینیوم، سدیم و غیره با غلظت ۱ میلی مولار روی فعالیت بیولومینسانسی آن تست شد. نتایج نشان داد که استفاده از فتوپروتئین آکوئورین جهت اندازه گیری یون کلسیم از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است.

کلمات کلیدی: فتوپروتئین های وابسته به کلسیم، آکوئورین، بیولومینسانس، اختصاصیت

* نویسنده مسئول: رضا حسن ساجدی . آدرس ایمیل:Sajedi_R@Modares.ac.ir

مقدمه

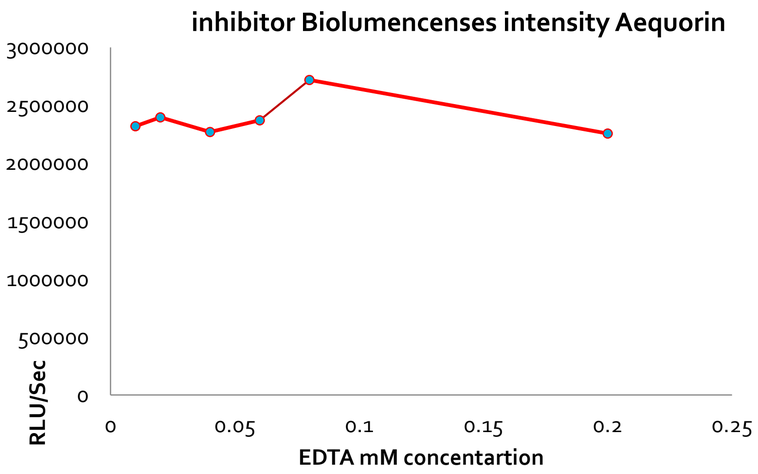
از میان فتوپروتئین ها، انواع حساس به یون کلسیم و حساس به سوپراکسید برای کاربردهای آنالیتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در طول چند دهه‌ی گذشته از فتوپروتئین اکوئورین به‌طور گسترده‌ایی در حوزه های مختلف علوم زیستی استفاده شده است. به همین دلیل در ادامه این فتوپروتئین بیشتر مورد بررسی قرارگرفته است. اعضای این خانواده از طریق واحدهای ساختاری همولوگی به نام EF-hand، به طور انتخابی به کلسیم متصل می‌شوند. فتوپروتئین-ها متشکل از یک آپوپروتئین و یک کروموفور هستند که به صورت غیرکوالانسی اما محکم به پروتئین متصل شده‌اند. کروموفور، ترکیب لوسیفرینی به نام کلنترازین و اکسیژن مولکولی است و تنها عامل مورد نیاز جهت شروع واکنش، یون کلسیم است. فتوپروتئین اکوئورین با ۱۸۹ آمینواسید و وزن مولکولی در حدود ۲۲ کیلودالتون جدا شده از عروس دریایی *Aequorea victoria*، یکی از محبوب-ترین شناساگرهای یون کلسیم است که به طور گسترده در مطالعات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

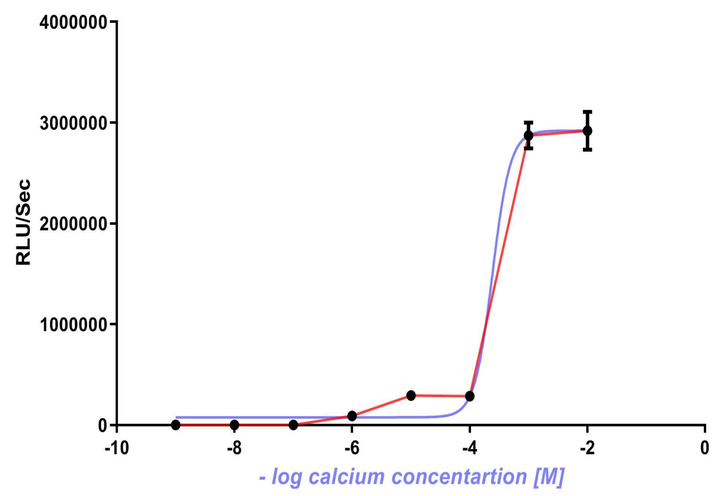
در این پژوهش توالی کدکننده فتوپروتئین آکوئورین در pET28a که از قبل کلون شده بود به روش شیمیایی به میزبان E. coli سویه BL21 (DE3) انتقال داده شد و بیان پروتئین با القای IPTG صورت گرفت و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص سازی انجام شد سپس با استفاده از تکنیکSDS-PAGE میزان خلوص و اندازه پروتئین مشخص شد و با تکنیک برادفورد غلظت پروتئین اندازه گیری و دیالیز به منظور حذف نمک های حاصل از مراحل تخلیص و یون زدایی کلسیم در غلظت های 0.1میلی مولار EDTAدر ظروف پلاستیکی صورت گرفت سپس نشر بیولومینسانس آکوئورین در بافر مربوط به Regenaration با استفاده از غلظت های مختلف شلاتور EDTA از غلظت 2 mM تا 0.01mMبهینه شد، برای ادامه ی اندازه گیری و رسم منحنی Dose- response آنالیت کلسیم نسبت به فتوپروتئین از بافر Regenaration با غلظت های EDTA 0.01Mm، BSA %1 و Tris-Hcl ۵۰mM با pH ۷.۵ استفاده شد و محلول $CaCl_2$ در دامنه ی غلظتی نانومولار تا میلی مولار در ظروف پلاستیکی acid wash شده تهیه شد. با توجه به بهینه شدن نسبت مولی و زمان فتوپروتئین به سوبسترا کلنترازین در تحقیقات قبلی به منظور بیشترین نشر بیولومینسانس از غلظت 2.0 mgآکوئورین و ۱۰ µM کلنترازین در زمان ۱۶ ساعت و دمای ۴- استفاده شد سپس از غلظت های 10^{-9}تا 10^{-2} منحنی رفتار وابسته به غلظت کلسیم رسم گردید و پارامتر هایی مثل LOD، EC50 و kd با نرم افزار GraphPad Prism محاسبه شد.

همچنین برای تعیین اختصاصیت اکوئورین به یون کلسیم از غلظت های ثابت ۱ میلی مولار نمک های کلرید مختلف به منظور بررسی اختصاصیت اکوئورین حساس به کلسیم استفاده شد و میزان نشر بیولومینسانس بقیه کاتیون ها با کلسیم مقایسه شد.

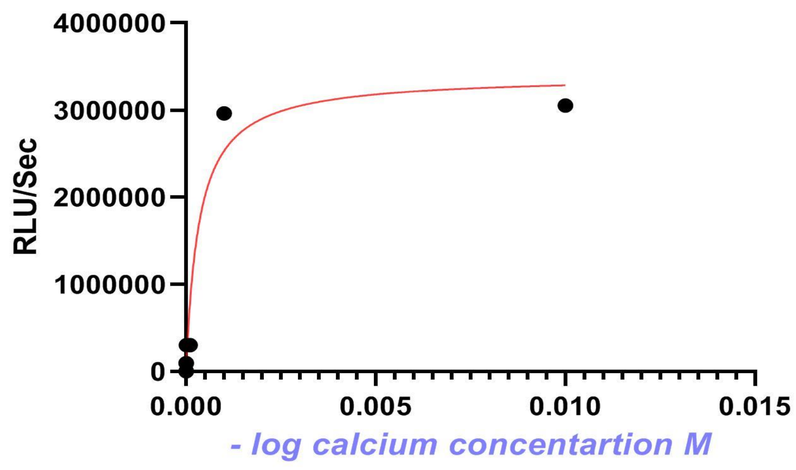
نتایج



استفاده از غلظت های مختلف EDTA به منظور مهار نشر بیولومینسانس



رفتار وابسته به غلظت کلسیم نسبت به فتوپروتئین

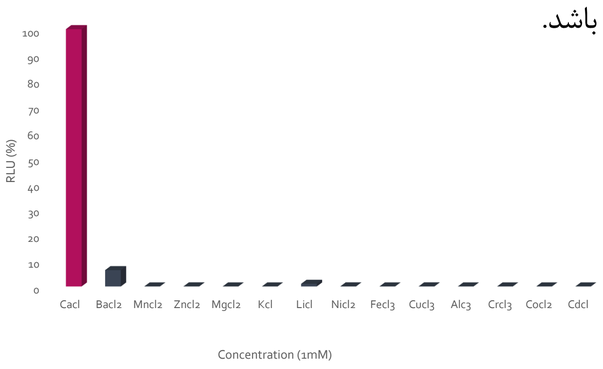


گراف بررسی و محاسبه ی ligand- binding

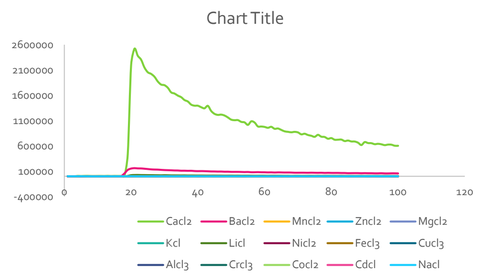
بحث و نتیجه گیری

در مطالعات قبلی یون کلسیم از طریق Calcium-binding protein های مختلف و روش هایی نظیر رزین chelex-100 ،TCAو به کار گیری شلاتور های مختلف نظیر EGTA و EDTA اندازه گیری می شد ولی با گزاف هزینه و زمان بری بالا، در این پژوهش، روشی آسان و ارزان تر از روش های فوق به منظور Biosensing کلسیم با استفاده از فتوپروتئین ارائه شد.

نتایج حاصل از اختصاصیت به ما نشان داد که فتوپروتئین آکوئورین حساسیت بسیار معنا داری به کلسیم نسبت به دیگر کاتیون ها دارد، در نتیجه این روش بسیار کارامد با حساسیت و اختصاصیت بالا می باشد.



نمودار ستونی اختصاصیت فتوپروتئین آکوئورین با P value= <0.0001



نمودار kinetic decay rate مربوط به آکوئورین در برابر کاتیون های مختلف

منابع

1. Daunert S, Deo SK. Photoproteins in bioanalysis: John Wiley & Sons; 2006.
2. Grinstead K, Joel S, Zingg J-M, Dikici E, Daunert S. Enabling Aequorin for biotechnology applications through genetic engineering. Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 3: Springer; 2015. p. 149-79.
3. Bonora M, Giorgi C, Bononi A, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Rizzuto R, Pinton P: Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes. *Nature protocols* 2013, 8(11):2105-2118.
4. Charbonneau H, Walsh KA, McCann RO, Prendergast FG, Cormier MJ, Vanaman TC (1985) Amino acid sequence of the calcium dependent photoprotein aequarin.biochemistry.24:6762-676