دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۱، صفحه ۴۵ – ۳۷ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(1): 37-45

نقش اسیدهای آمینه هیستیدین ۱۶، تیروزین ۸۲ و تریپتوفان ۸۶ در شیفت نوری، فعالیت و پایداری حرارتی فوتوپروتئین اکورین

فائزه قنبرطلب [۱]، مهدی زین‌الدینی [۱*]، سامان حسین‌خانی [۲]، معصومه اسماعیل‌نژاد [۱]، سیده الهه حسینی [۱]، معصومه لالی [۱]

[۱] گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
[۲] دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(دریافت مقاله: ۹۲/۳/۲۱- پذیرش مقاله: ۹۲/۶/۱۶)

چکیده:

زمینه: اکورین فوتوپروتئینی حساس به کلسیم است که از آپوآکورین (۱۸۹ اسید آمینه)، اکسیژن و کوالنترازین (کروموفور ایمیدازوپیرازین) تشکیل شده است. عملکرد این پروتئین نوری در حضور کلسیم، نشر نور آبی (۴۶۹ نانومتر) است. مطالعات نشان داده است که سه اسید آمینه **H16**، **Y82** و **W86** در عملکرد و شیفت نوری پروتئین اکورین نقش دارد. در تحقیق حاضر به منظور بررسی ارتباط ساختار- عملکرد پروتئین از جهش‌های ترکیبی استفاده شد تا نقش و اهمیت جایگاه‌های مورد نظر، در حالت تک و ترکیبی، به‌دست آید.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش جهش‌های هدفمند، جهش‌های تکی و ترکیبی در پلاسمید مورد نظر انجام گرفت و فوتوپروتئین اکورین در حالات تک جهشی و جهش‌های ترکیبی، به‌دست آمد. در مرحله بعد پایداری حرارتی و فعالیت نوری پروتئین‌های به‌دست آمده با استفاده از لومینومتر، اندازه‌گیری و شیفت نوری آن‌ها با استفاده از اسپکتروفلوریمتر، اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان داد که نقش جایگاه **W86** در شیفت نوری و نقش **H16** در عملکرد از سایر موقعیت‌های دیگر بالاتر است. همچنین پایداری حرارتی جهش اعمال شده در موقعیت **W86** نسبت به سایر جهش‌ها عملکرد بهتری را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که جایگاه اسید آمینه **W86** در شیفت نوری و پایداری حرارتی اکورین، از **Y82** و **H16** بالاتر است و می‌توان از این جهش جهت تولید پروتئین کاراتر در راستای حسگری و سایر کاربردهای مربوطه استفاده نمود.

واژگان کلیدی: اکورین، جهش، شیفت نوری، پایداری حرارتی

* تهران، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران

Email :zeinoddini52@mut.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

مقدمه

فوتوپروتئین اکورین (Aequorin photoprotein) نوعی پروتئین نوری است که اولین بار توسط یک دانشمند ژاپنی مقیم آمریکا بنام اوسامو شیمومورا (Shimomura)، از عروس دریایی (Aequorea victoria) شناسایی شد. این پروتئین قدرت انتشار نور را در محلول‌های آبی در اثر افزودن مقدار کمی کلسیم (+Ca2) داراست. نکته جالب این است که لومینسانس این پروتئین حتی در غیاب اکسیژن نیز انجام‌پذیر است. شیمومورا در مطالعات بعدی دریافت که نور نشر شده در اثر یک واکنش درون ملکولی که در مجاورت پروتئین صورت می‌گیرد، اتفاق می‌افتد (۱).

اکورین، پروتئینی با ۱۸۹ اسید آمینه است که دارای ۳ جایگاه اتصال به کلسیم در هنگام فعالیت است. اکورین طبیعی مخلوطی از ۱۲ نوع ایزوفرم است که به‌صورت A، B و C وغیره نام‌گذاری می‌شوند. کمپلکس اکورین شامل سه بخش مجزا شامل یک آپوپروتئین ۲۲ کیلودالتونی بنام اپواکورین (apoaequorin)، مولکول اکسیژن و یک سوبسترا به‌نام کوالنترازین (coelenterazine) (از خانواده لوسیفرین) است. در حقیقت کمپلکس اکورین مشابه فعالیت آنزیمی، طوری عمل می‌کند که وقتی ۳ یون کلسیم به این کمپلکس باند می‌شود، کوالنترازین به کوالنترامید (coelenteramid)، اکسیده می‌شود و سبب آزاد شدن اپواکورین، CO2 و نوری آبی رنگ با طول موج ۴۶۹ نانومتر می‌شود (۵-۲). به‌دلیل حساسیت بالای اکورین به غلظت کلسیم، سازگاری زیستی آن با سلول‌های زنده و دارا بودن درصد بسیار بالای سیگنال نسبت به نویز پس زمینه، از این فوتوپروتئین به‌عنوان مارکر جهت شناسایی مقادیر پایین محصولات معدنی (کمتر از ۰/۰۱ ملکول) و به خصوص کلسیم استفاده می‌شود (۸-۶).

مطالعات گذشته نشان داده است که سه اسیدآمینه هیستدین ۱۶ (H16)، تیروزین ۸۲ (Y82) وتریپتوفان ۸۶ (W86) نقش‌های کلیدی در فعالیت نوری اکورین دارند به‌طوری که جهش در هیستدین ۱۶ سبب کاهش شدید فعالیت (۹)، جهش در تیروزین ۸۲ سبب شیفت نوری به سمت سبز (۱۰) و تغییر در تریپتوفان ۸۶ سبب ایجاد دو پیک نشری (۱۱) می‌گردد. ولی اهمیت آن‌ها به‌صورت ترکیبی با یکدیگر مقایسه نشده است. با توجه به اینکه واکنش متقابل اسیدهای آمینه مذکور در جایگاه فعال فوتوپروتئین با همدیگر و با کوالنترازین نقش کلیدی در فعالیت و شیفت نوری پروتئین بازی می‌کند، انجام جهش‌های همزمان در این سه موقعیت می‌تواند اهمیت آن‌ها را بیشتر مشخص سازد. همچنین مطالعات پایداری حرارتی که تاکنون انجام شده است، بیشتر بر روی جایگاه‌های اتصالی کلسیم متمرکز بوده است (۱۲ و ۱۳) و کمتر جایگاه‌های دخیل در فعالیت اکورین از منظر پایداری حرارتی مورد بررسی قرار گرفته است.

از سوی دیگر ارزیابی کمی ارتباط ساختار با عملکرد پروتئین که به QSAR [1] نیز معروف است، کمک زیادی به شناسایی فاکتورهای ساختاری کلیدی مؤثر در فعالیت پروتئین می‌کند. بر این اساس می‌توان مولکول‌های تأثیرگذار در بخش‌های فعال و عملکردی پروتئین را شناسایی نمود. این روش در شناسایی و ساخت داروهای جدید بسیار مؤثر است (۱۷-۱۴). در نتیجه انجام جهش‌های هدفمند در پروتئین این اجازه را به ما می‌دهد تا اسیدهای آمینه کلیدی را در یک پروتئین شناسایی نماییم. همچنین در بسیاری موارد، چند اسیدآمینه در مجاورت فضایی با یکدیگر سبب ایجاد عملکرد اختصاصی خاصی می‌شوند و در صورت تغییرات همزمان در آن‌ها، عملکرد پروتئین به‌صورت ویژه‌ای

[1] Quantitative Structure Activity Relationship

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

تحت تأثیر قرار می‌گیرد. لذا انجام جهش‌های ترکیبی از این منظر حائز اهمیت است. در این حالت اهمیت هر یک از اسیدهای آمینه در حالت جهش‌های تکی و ترکیبی می‌تواند به‌دست آید (۱۸ و ۱۹).

اکورین و فوتوپروتئین‌های مشابه، در فناوری زیستی دارای کاربردهای گسترده هستند که از این منظر مورد توجه محققان قرار دارند. دست‌یابی به فوتوپروتئین‌های جهش یافته با شیفت نوری و عملکرد و پایداری مناسب، باعث استفاده از آن‌ها به‌عنوان پروتئین‌های گزارشگر نوین در کیت‌های تشخیصی خواهد شد (۲۵-۲۰).

در مطالعه حاضر ما از جهش‌های ترکیبی هدفمند به‌منظور مطالعه ساختار- عملکرد فوتوپروتئین اکورین در خصوص شیفت نوری و پایداری حرارتی استفاده کردیم.

مواد و روش‌ها

تولید جهش‌های تک و ترکیبی

برای ایجاد جهش‌ها تک و ترکیبی، مطابق جدول ۱، شش جفت پرایمر به‌منظور انجام جهش های هدفمند (Site Directed Mutagenesis)، طراحی و سنتز گردید. لازم به توضیح است که پلاسمید pET-aequorin (کلون ژن رمز کننده اکورین درون جایگاه‌های برش *NdeI* و *EcoRI* پلاسمید pET21a) از مطالعه قبلی تهیه گردید (۲۶).

بر اساس روش جهش هدفمند، تکثیر پلاسمیدی با استفاده از آنزیم پلیمراز PWO صورت گرفته و پس از هضم رشته‌های اولیه با آنزیم محدودگر *DpnI*، درون باکتری‌های مستعد شده XL-1 Blue انتقال یافت. در ادامه استخراج پلاسمید از کلون‌های حاصله به‌دست آمده و با استفاده از دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *EcoRI*، صحت کلون‌ها تأیید و جهت بررسی جهش‌های مربوطه به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. لازم به توضیح است جهت انجام جهش‌های ترکیبی، از موتان‌های تکی به‌عنوان الگو استفاده گردید تا جهش‌های ترکیبی به جهش الگوی اولیه اضافه گردد.

جدول ۱) پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی
F-H16E	5′ - C AAC CCG CGT TGG ATT GGT CGT GAG AAA CAC ATG TTC AAC TTC -3′
R-H16E	5′ - GAA GTT GAA CAT GTG TTT CTC ACG ACC AAT CCA ACG CGG GTT G-3′
F-Y 82-F	5′ - GAG ACT GAT TGG CCG GCG TTC ATC GAG GGC TGG AAG AAA C -3′
R-Y 82-F	5′ - G TTT CTT CCA GCC CTC GAT GAA CGC CGG CCA ATC AGT CTC -3′
F-W 86-F	5′ - TGG CCG GCG TAC ATC GAG GGC TTT AAG AAA CTG GCG ACC GAT G -3′
R-W 86-F	5′ - C ATC GGT CGC CAG TTT CTT AAA GCC CTC GAT GTA CGC CGG CCA -3′

تخلیص پروتئین‌های جهش یافته

پس از تأیید جهش‌های اعمال شده (انجام تعیین ترادف)، ۴ نوع پلاسمید حاصله درون باکتری (DE3) BL21 انتقال یافته و با استفاده از ۱ میلی‌مولار IPTG القاء گردید. با توجه به طراحی دنباله هیستدین در انتهای آمینو پروتئین، پس از القاء با استفاده از ستون Ni-NTA، ۵ نوع پروتئین H16E، aeq، aeq-Y82F، aeq-W86F، aeq-Y82F/W86F و aeq-H16E/Y82F/W86F خالص سازی و با استفاده از SDS-PAGE خلوص آن‌ها مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد تعیین غلظت شده و در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به همراه ۳۰ میلی‌مولار سوربیتول، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، ذخیره‌سازی شدند.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

ارزیابی فنوتیپی جهش‌ها

۵ میکروگرم از نمونه پروتئین بدون جهش یا جهش یافته به ۱۵ میکرولیتر از بافر ۱ (۵۰ میلی‌مولار تریس (pH8) حاوی ۵ میلی‌مولار EDTA و ۱۰ میلی‌مولار DTT اضافه شد. سپس ۵ میکرومولار از کوالنترازین hcp به آن افزوده شده و به‌مدت حداقل یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انکوبه گردید. در نهایت نیز پس از ۱۰ الی ۲۰ بار رقیق‌سازی مخلوط مذکور با بافر ۱، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از بافر ۲ (بافر ۱ حاوی ۱۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ بلافاصله نشر نوری (relative luminescence ،RLU) به کمک دستگاه لومینومتر (GmbH، Berthold Detection Systems)، خوانش شد. آزمایشات با سه بار تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

ارزیابی نشر نوری جهش‌ها

ماکزیمم نشر نوری اکورین اولیه و جهش یافته با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر مدل perkin Elmer، به‌دست آمد. در اینحالت طول موج تحریکی اعمال نشده و اسکن نشر نوری بین ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر پس از اضافه کردن ۵ میکرومولار کوالنترازین و ۱۵ میلی‌مولار کلسیم کلراید ثبت گردید. در این سنجش غلظت تمامی پروتئین‌های مورد استفاده ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

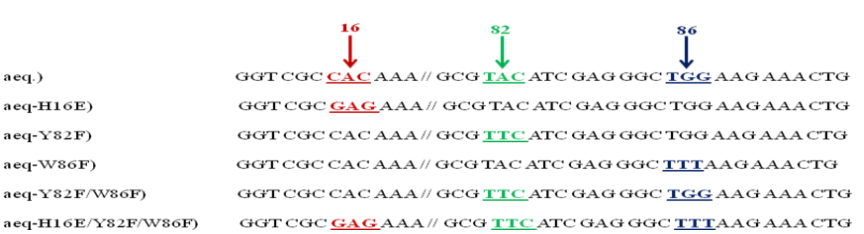
ارزیابی پایداری حرارتی جهش‌ها

پایداری حرارتی اکورین اولیه و جهش یافته با اعمال شوک دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه آزمایش شد. سپس فعالیت نوری پروتئین، مشابه روش تشریح شده در بالا، به‌صورت RLU به‌دست آمد. در این سنجش غلظت تمامی پروتئین‌های مورد استفاده ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین آزمایشات با سه بار تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

تهیه اکورین‌های جهش یافته

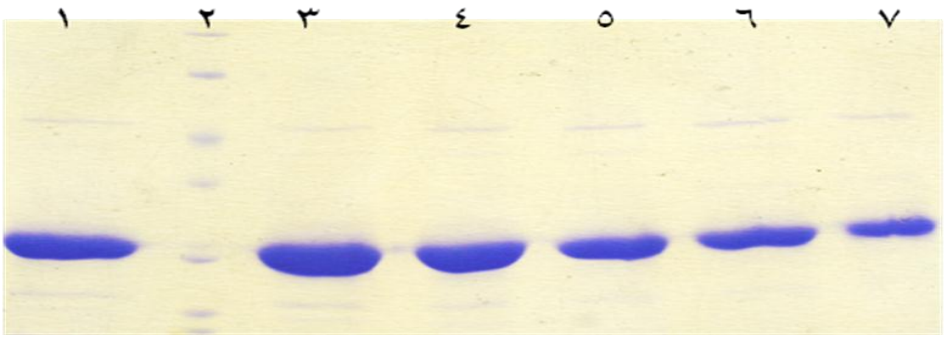
پس از انجام جهش‌های هدفمند تک و ترکیبی، محصول PCR بر روی ژل آگاروز آنالیز شد که، تکثیر پلاسمید با اندازه حدود ۶ کیلو باز (kb) صورت گرفته است. همچنین پس از هضم آنزیمی *DpnI* و انتقال پلاسمید به درون باکتری E.coli، از کلون‌های به‌دست آمده، مجدداً استخراج پلاسمید صورت گرفته و با دو آنزیم *NdeI* و *EcoRI* هضم شد که، آزاد شدن قطعه حدود ۶۲۵ بازی بیانگر حضور اکورین‌های جهش یافته درون پلاسمید است. پلاسمیدهای تأیید شده جهت تعیین ترادف، به شرکت مربوطه ارسال گردید که نتایج تعیین ترادف نیز بیانگر صحت جهش‌های اعمال شده بود (شکل ۱).



شکل ۱) نتایج حاصل از تعیین توالی cDNA اکورین اولیه (aeq.) با نمونه جهش یافته در موقعیت ۱۶، ۸۲ و ۸۶ به‌صورت تک جهشی و ترکیبی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

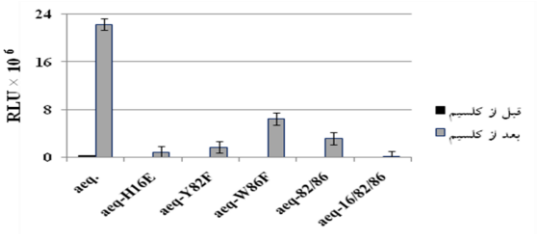
در مرحله بعد پلاسمیدهای مربوطه درون باکتری بیانی، انتقال یافته و پس از القاء با IPTG با استفاده از ستون‌های Ni-NTA خالص شدند. مطابق شکل ۲، خلوص مطلوب از پروتئین‌های جهش یافته به‌دست آمده است.



شکل ۲) آنالیز اکورین اولیه (WT) و جهش یافته با استفاده از SDS-PAGE. (۱)اکورین اولیه، (۲) مارکر وزن ملکولی (به ترتیب از بالا به پایین: ۱۱۶، ۶۶، ۴۵، ۳۵،۲۵، ۱۸،۴، ۱۴،۴ کیلودالتون)، (۳) aeq-H16E، (۴) aeq-Y82F،(۵) aeq-W86F، (۶) aeq-Y82F/W86F، (۷) aeq-H16E/Y82F/W86F.

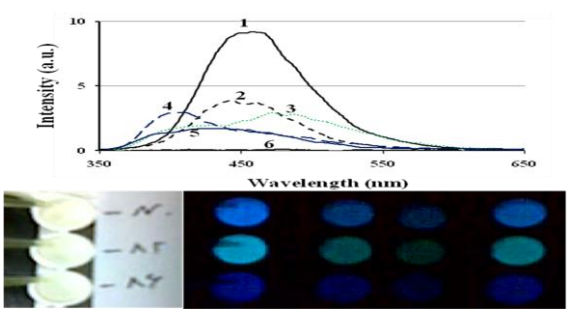
نتایج عملکرد اکورین‌های جهش یافته

فعالیت اکورین اولیه و جهش یافته با استفاده از روش سنجش ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها و دستگاه لومینومتر صورت گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که عملکرد اکورین‌های جهش یافته به شدت کاهش یافته و در تمامی موارد به کمتر از ۳۰ درصد نمونه اولیه می‌رسد (شکل ۳).



شکل ۳) آنالیز عملکرد اکورین اولیه (aeq.) و جهش یافته در حالت قبل و بعد از اضافه کردن کلسیم. (آزمایشات با سه بار تکرار می‌باشد.)

از سوی دیگر ماکزیمم نشر نوری اکورین اولیه و جهش یافته بیانگر شیفت نوری در aeq-86 از آبی به سمت سبز (طول موج بلندتر) و در aeq-86 و aeq-۸۲/۸۶ از آبی به سمت بنفش (طول موج کوتاه‌تر) بوده است. ولی در سایر جهش‌ها تغییرات واضحی مشاهده نشد (شکل ۴).

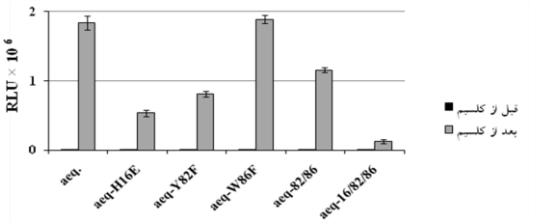


شکل ۴) آنالیز ماکزیمم نشر نوری اکورین اولیه و جهش یافته. (بالا) منحنی مقایسه نشر نوری اکورین اولیه (۱) با نمونه‌های جهش یافته aeq-H16E (۲)، aeq- Y82F،(۳) aeq- Y82F/W86F، (۴) aeq- W86F، (۵) aeq-H16E/Y82F/W86F (۶) (پایین) مقایسه فنوتیپ اکورین اولیه (N) با دو نمونه جهش یافته aeq-Y82F و aeq-W86F در شرایط تاریکی و پس از اضافه کردن کلسیم

نتایج پایداری اکورین‌های جهش یافته

پایداری اکورین اولیه و جهش یافته با استفاده از اعمال شوک حرارتی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که پایداری پروتئین aeq-86 از دیگر جهش‌ها، بالاتر است (شکل ۵).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]



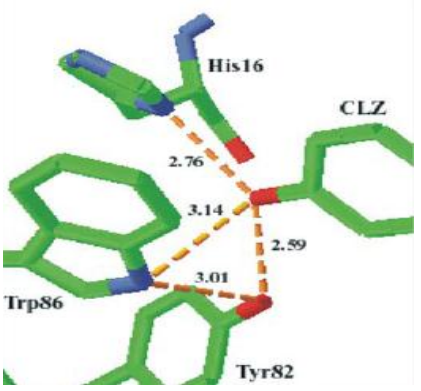
شکل ۵) آنالیز پایداری اکورین اولیه (aeq) و جهش یافته در حالت قبل و بعد از اضافه کردن کلسیم. (آزمایشات با سه بار تکرار می‌باشد.)

بحث

در اکورین سه اسید آمینه‌ی هیستدین۱۶، تیروزین ۸۲ و تریپتوفان ۸۶ دارای نقش کلیدی جهت فعالیت بیولومینسانس این پروتئین هستند (شکل ۶).

به‌طوری که اسید آمینه هیستیدین به‌عنوان یک منبع دریافت پروتون بالقوه از گروه فنولیک کوالنترامید عمل می‌کند. در صورتی که اسید آمینه تریپتوفان به‌عنوان دهنده پروتون به این بخش، عمل کرده و گروه هیدروکسیل تیروزین نیز به‌عنوان دهنده اضافه پروتون عمل می‌کند. در این حالت فعال شدن فوتوپروتئین با کلسیم به ارائه این پروتون اضافه بستگی دارد چرا که وجود پروتون اضافه سبب کاهش اسیدیته گروه فنولیک کوالنترامید در حالت برانگیخته می‌شود (۲ و ۲۷). به همین دلیل استفاده از آنالوگ‌های کوالنترازین به همراه ایجاد جهش‌های هدفمند سبب تغییر در فنوتیپ فوتوپروتئین‌های مورد مطالعه می‌گردد (۲۸).

براساس مطالعات صورت گرفته، انجام جهش هدفمند در مورد هیستدین۱۶ سبب کاهش چشمگیر فعالیت پروتئین می‌شود (۹). همچنین با توجه به‌اینکه گروه OH از تیروزین ۸۲ به‌وسیله یک باند هیدروژنی به اتم اکسیژن گروه ۶-(P-hydroxy) Pheny۱ از سوبسترای کوالنترازین اتصال می‌یابد (شکل ۶)، در اثر جهش در این اسید آمینه و تبدیل آن به فنیل‌آلانین (یعنی حذف گروه هیدروکسیل از تیروزین ۸۲) مشخص شده است که یک شیفت نوری از آبی به سبز در این فوتوپروتئین مشاهده می‌شود (۱۰). مطالعات فوق بیانگر این نکته است که باند هیدروژنی اتم اکسیژن گروه ۶-(P-hydroxy) Pheny۱ از کوالنترامید یک فاکتور کنترلی اولیه جهت ویژگی اسپکتروم نشر نوری اکورین می‌باشد. به‌طوری که رفع گروه OH از تیروزین ۸۲ فوتوپروتئین اکورین، سبب تغییر در ویژگی این اسپکتروم می‌شود.



شکل ۶) تصویری از نحوه ارتباط سه اسید آمینه کلیدی اکورین با گروه 6-(*P*-hydroxy) Phenyl از کوالنترازین (CLZ).

از سوی دیگر در حین عملکرد اکورین، گروه ایندول از تریپتوفان ۸۶ نیز در اتصال به اتم اکسیژن گروه ۶-(P-hydroxy) Pheny۱ از سوبسترای کوالنترازین می‌باشد و تغییر در این اسید آمینه و تبدیل آن به فنیل آلانین سبب ایجاد فوتوپروتئینی با طول موج پایین‌تر (حدود ۴۰۰ نانومتر) می‌گردد (۱۱ و ۲۹).

به‌طور کلی بر اساس مطالعات صورت گرفته، جهش‌هایی که تاکنون بر روی فوتوپروتئین اکورین انجام شده است، به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند، دسته اول جهش‌های SloDK ۲ که سبب تغییر در میزان تضعیف نشر نور به کندی و آهستگی می‌شوند. دسته دوم، جهش‌های درخشان و تابان (Bright)

[2] Slow decay rate

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

است که لومینسانس بالایی را در باکتری‌ها نشان می‌دهند چرا که سبب افزایش حساسیت کلسیم یا پایداری فوتوپروتئین می‌شود.

برخلاف جهش‌های SloDK که در آن‌ها هم میزان تضعیف نشر نور و هم حساسیت کلسیم، تغییر می‌کند، جهش‌های تابان، تغییرات حساسیت کلسیم را با کمترین تغییرات تضعیف نشر نور، نشان می‌دهد. به‌نظر می‌رسد هر دو جهش مذکور در اثر یک جهش نقطه‌ای و تک و جایگزین یک اسید آمینه در موتیف‌های EF-hand یا آلفا هلیکس‌های تنظیم شده کنار آن‌ها، صورت می‌گیرد (۱۲، ۱۳و ۳۰).

در یک دسته‌بندی دیگر اکورین جهش یافته به دو گروه دیگر تقسیم‌بندی می‌شوند: جهش‌های پایدار حرارتی (Thermostable mutant) و جهش‌های با طول لومینسانس بالاتر (Persistent mutant) که در نوع دوم در واقع تضعیف نشر نور، دیرتر صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر جهش‌های نوع دوم همان جهش‌های SloDK در طبقه‌بندی اشاره شده در بالا می‌باشد.

بر اساس مطالعات موجود سه جهش Lys17Arg، Gln168Arg و Leu170ILe. سبب افزایش پایداری حرارتی فوتوپروتئین اکورین می‌شود. از سوی دیگر شش جهش Glu35 Gly، Asp117Gly، Glu128Gly، Phe149Gly، Asp153Gly و Val44Ala سبب به تأخیر افتادن تضعف نشر نور در اکورین می‌گردد (۳۰ و ۳۱).

انجام جهش‌های تک و ترکیبی در تحقیق حاضر نشان داد که تمامی جهش‌های اعمال شده سبب کاهش فعالیت نوری اکورین در مقایسه با نمونه اولیه می‌شود. علاوه‌بر این مشخص گردید، اهمیت اسید آمینه هیستدین ۱۶ در فعالیت نوری اکورین از دو اسید آمینه دیگر برجسته‌تر است که این نتایج با آزمایشات قبلی مطابقت دارد (۱۰). ولی از لحاظ شیفت نوری مشخص گردید که گروه ایندول در تریپتوفان ۸۶ در مقایسه با گروه هیدروکسیل از تیروزین ۸۲ اهمیت بیشتری دارد. به‌طوری که جهش ترکیبی در هر دو موقعیت ۸۲ و ۸۶ سبب شیفت نوری به سمت طول موج‌های پایین‌تر، می‌شود. همچنین مطالعات پایداری حرارتی نشان داد که حذف گروه ایندول در تریپتوفان ۸۶ می‌تواند سبب افزایش پایداری حرارتی در مقایسه با سایر جهش‌های دیگر گردد.

با توجه به کارایی بالای فوتوپروتئین اکورین، انجام جهش‌های مفید به‌منظور افزایش پایداری ساختاری و عملکرد بهینه‌ی این پروتئین، می‌تواند در راستای استفاده مؤثرتر پروتئین اکورین تعریف گردد. درنتیجه مطالعات تکمیلی می‌تواند سبب دست‌یابی به پروتئین قوی‌تر از نظر هر دو جنبه عملکردی و ساختاری گردد.

References:

1.Shimomura, O. A Short Story of Aequorin. Biol Bull 1995; 189 , 1-5.
2.Head, J.F., Inouye, S., Teranishi, K., et al. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. Nature, 2000; 405 , 372–6.
3.Toma S., Chong K.T., Nakagawa A, et al. The crystal structures of semi-synthetic aequorins. Protein Sci 2005; 14: 409–16.
4.Shimomura O. Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. Biochem Biophys Res Commun 1995; 211: 359–63.
5.Inouye S. Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine, FEBS Lett 2004; 577: 105–10.
6.Brini M, Pinton P., Pozzan T, et al. Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring [Ca2+] in the various compartments of a living cell. Microsc Res Tech 1999; 46: 380–9.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

7.Brini M. Calcium-sensitive photoproteins. Methods. 2008; 46: 160–6.
8.Blinks JR. Use of photoproteins as intracellular calcium indicators. Environ Health Perspect 1990; 84: 75-81.
9.Dikici E., Qu X, Rowe L, et al. Aequorin variants with improved bioluminescence properties. Protein Eng Des Sel 2009; 23: 1-6.
10.Stepanyuk GA, Golz S, Markova SV, et al. Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein. FEBS Lett 2005; 579: 1008–14.
11.Ohmiya Y, Ohashi M, Tsuj FI. Two excited states in aequorin bioluminescence induced by tryptophan modification. FEBS Lett 1992; 301: 197–201.
12.Tsuzuki K, Tricoire L, Courjean O, et al. Termostable mutants of the photoprotein aequorin obtained by in vitro evolution. J Biol Chem 2005; 280: 34324-31.
13.Tricoire L, Tsuzuki K, Courjean O, et al. Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis. Proc Natl Acad Sci 2006; 103: 9500-5.
14.Gedeck P, Rohde B, Bartels C. QSAR—how good is it in practice? Comparison of descriptor sets on an unbiased cross section of corporate data sets. J Chem Inf Model 2006; 46: 1924–36.
15.Rodgers SA, Davis AM, van de Waterbeemd H. Time-series QSAR analysis of human plasma protein binding data. QSAR Comb. Sci 2007; 26: 511–21.
16.Weaver S, Gleeson MP. The importance of the domain of applicability in QSAR modeling. J Molecul Graph Model. 2008; 26: 1315–26.
17.Kubinyi H. QSAR and 3D QSAR in drug design. Drug Des 1997; 2: 457-67.
18.Hsieh PC, Vaisvila R. Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis. Methods Mol Biol 2013; 978: 173-86.
19.Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. Anal Biochem 1997; 254: 157-78.
20.Galvan B, Christopoulos TK. Bioluminescence hybridization assays using recombinant aequorin: Application to detection of prostate specific antigen mRNA. Anal Chem 1996; 68: 3545–50.
21.Xiao L, Yang C, Nelson CO, et al. Quantitation of RT-PCR amplified cytokine mRNA by aequorin-based bioluminescence immunoassay. J Immunol Meth 1996; 199: 139-47.
22.Deo SK, Lewis JC, Daunert S. Bioluminescence Detection of Proteolytic Bond Cleavage by Using Recombinant Aequorin. Anal Biochem 2000; 28: 87–94.
23.Frank LA, Borisova VV, Markova SV, et al. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay. Anal Bioanal Chem 2008; 391: 2891–6.
24.Rider TH, Petrovick MS, Nargi FE, et al. AB Cell-Based Sensor for Rapid Identification of Pathogens. Sci 2003; 301: 213-5.
25.Erikaku T, Zenno S, Inouye S. Bioluminescent immunoassay using a monomeric Fab9-photoprotein aequorin conjugate. Biochem Biophys Res Commun 1991; 174: 1331–6.
26.Zeinoddini M, Khajeh K, Hosseinkhani S, et al. Stabilisation of Recombinant Aequorin by Polyols: Activity, Thermostability and Limited Proteolysis. Appl Biochem Biotechnol 2013; 170: 273-80.
27.Shimomura O, Teranishi K. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine. Luminescence 2000; 15: 51-8.
28.Rowe L, Rothert A, Logue C, et al. Spectral tuning of photoproteins by partnering site-directed mutagenesis strategies with the incorporation of chromophore analogs. Protein Eng Des Sel 2008; 21: 73-81.
29.Kurose K, Inouye S, Sakaki Y, et al. Bioluminescence of the Ca2+ binding photoprotein aequorin after cystein modification. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 80–4.
30.Armestrong L, Hsu M, Li M. Modified photoproteins with increased affinity for calcium and enhanced bioluminescence and uses thereof. Google Patents; 2010.
31.Lambolez B, Gibelin N, Bourout G, et al. Mutated photoproteins and their uses. Google Patents; 2002.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]

ISMJ 2015; 18(1): 37-45

Orginal Article

The role of His 16, Tyr 82 and Trp 86 in color shift, activity and thermostability of aequorin photoprotein

F. Ghanbartalab [1], M. Zeinoddini [1], S. Hosseinkhani [2], M. Esmailinejad [1], SE. Hosseini [1], M. Laali [1]*

[1] Department of Genetic Engineering, Bioscience and Biotechnology Research Center, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran

[2] Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran

(Received 11 Jun, 2013 Accepted 7 Sep, 2013)

Abstract

Background: Aequorin is a calcium sensitive photoprotein composed of apoaequorin (189 amino acid), oxygen and coelenterazine (imidazopyrazine chromophore). Activity of this photoprotein in calcium presence is blue photon emission (469 nm). Studies have shown that three amino acids H^{16}, Y^{82}, W^{86} are involved in color shift and activity of Aequorin. In this work, for study of structural-functional relationship, combinational mutant was used for determine of the interest places importance in single and combination state.

Materials and Methods: Using site directed mutagenesis, the single and multiple mutations done in plasmid and mutated aequorin in single and multiple states were prepared. Next, thermostability, activity and color shift of produced protein determined using luminometer and spectrofluorimetry, respectively.

Results: We found that W86 and H16 play a more critical role in color shift and activity respectively. In addition, mutation of W86 provides better termostability compared to other mutations.

Conclusion: This investigation was shown that the role of W86 in aequorin shift light and thermostability is better than Y82 and H16 and this mutant could be used for effective protein production in sensor and other applications.

Key words: Aequorin, Mutation, Color shift, Thermostability

**Address for correspondence:* Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, IRAN; E-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-11]