دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۳، صفحه ۵۰۷ – ۴۹۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(3): 497-507

بیان و تعیین خصوصیات فتوپروتئین i-Photina به‌عنوان یک پروتئین کارآمد

فاطمه احمدی [۱]، رضا حسن ساجدی [۱*]، مهدی زین‌الدینی [۲]

[۱] گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲] پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۶- پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۲۶)

چکیده

زمینه: امروزه استفاده از فتوپروتئین‌ها به واسطه سیگنال کم پس زمینه‌ای جایگاهی ویژه یافته است. از بین فتوپروتئین‌های رایج اکثر مطالعات روی فتوپروتئین اکورین متمرکز شده است. اما به دلیل پایین بودن شدت سیگنال و نیز بالا بودن سرعت خاموشی آن در سنجش‌های HTS (High-Throughput Screening) چندان کارآمد نمی‌باشد. در این راستا محققین در سال ۲۰۰۴ سه فتوپروتئین ارتقاء یافته به منظور تشخیص مقادیر ناچیز کلسیم به نام‌های Photina، i-Photina و c-Photina تولید کردند. این فتوپروتئین‌ها به واسطه سیگنال‌دهی قوی و نیز بادوام‌تر خود نسبت به موارد مشابه، دریچه‌ی نوینی را به روی کاربرد بیولومینسانس در سنجش‌های HTS گشوده‌اند و در حال حاضر فرم تجاری این سه فتوپروتئین توسط شرکت‌هایی از جمله Axxam و PerkinElmer عرضه می‌گردد. در این تحقیق فتوپروتئین i-Photina به‌دلیل شدت سیگنال بالاتر و همچنین پایداری نسبتاً مناسب آن نسبت به دو فتوپروتئین دیگر جهت مطالعه انتخاب شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا ترجیح کدونی ژن i-Photina بر اساس سلول‌های پستانداران و *E. coli* تنظیم گردید. سپس توالی مربوطه سنتز و در باکتری *E. coli* بیان شد. در مرحله بعد مقایسه‌ای بین خصوصیات بیولومینسانسی i-Photina و اکورین صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشانگر حدود ۱۴ برابری شدت سیگنال i-Photina نسب به اکورین می‌باشد. همچنین حساسیت به Ca^{2+} در i-Photina کمی کم‌تر از اکورین به‌دست آمد. سایر خصوصیات همچون پایداری پروتئین، طیف نشری و سرعت خاموشی در دو فتوپروتئین تفاوت قابل توجهی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: فتوپروتئین i-Photina علاوه‌بر اینکه جایگزینی مناسب برای اکورین در سنجش‌های HTS می‌باشد، می‌تواند به‌عنوان کاندیدی بالقوه برای ایجاد جهش‌های ژنتیکی به منظور بهبود خصوصیات بیولومینسانسی نیز مطرح گردد.

واژگان کلیدی: فتوپروتئین، i-Photina، شدت سیگنال بیولومینسانسی، HTS (High-Throughput Screening)

[*] تهران، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
E-mail:sajedi_r@modares.ac.ir

مقدمه

با توجه به اینکه فوتون‌ها با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته‌ای نظیر لومینومتری قابل آشکار شدن هستند، بیولومینسانس[1] به‌عنوان یک فناوری قوی جهت سنجش‌هایی با حساسیت بالا متقاضیان زیادی در دو دهه اخیر پیدا کرده است. از بین سیستم‌های بیولومینسانسی فتوپروتئین‌ها به‌دلیل ویژگی‌های معین و منحصر به فرد خود از قبیل سیگنال کم پس زمینه‌ای، حساسیت بالای ردیابی، کاربرد بی‌خطر، عدم سمیت سلولی، ماهیت غیرتهاجمی و غیره به آنالیزورهای بسیار عالی در مطالعات داخل[2] و خارج[3] سلولی تبدیل شده‌اند (۱). فتوپروتئین‌ها متشکل از کروموفور کلنترازین[4] هستند که به‌صورت غیرکوالانسی اما محکم به پروتئین متصل شده است. تغییرات کانفورماسیونی ایجاد شده در اثر اتصال یون کلسیم به جایگاه‌های خاصی در پروتئین (لوپ‌هایی از EF-handها) منجر به دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو کلنترازین و نهایتاً تولید نور آبی می‌شود. تاکنون بیش از هفت نوع فتوپروتئین وابسته به کلسیم از دو خانواده کیسه تنان[5] و شانه‌داران[6] جداسازی و مطالعه شده است که اکثر مطالعات روی فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم از خانواده کیسه تنان به ویژه ابلین[7] و اکورین[8] متمرکز شده است (۲) و (۳). با وجود این، استفاده از اکورین در سنجش‌های HTS[9] به‌دلیل پایین بودن بهره‌ی کوانتومی و بالا بودن سرعت خاموشی آن چندان کارآمد نیست؛ در این راستا در سال ۲۰۰۴ محققین شرکت Axxam ایتالیا فتوپروتئین‌هایی بهبود یافته از لحاظ شدت سیگنال و همچنین زمان نشر نور در سنجش‌های HTS به نام‌های Photina، c-Photina و i-Photina تولید کردند (۴). در حال حاضر شرکت‌های مختلفی از جمله PerkinElmer آمریکا رده‌های سلولی بسیار متنوعی از این سه فتوپروتئین را در قالب کیت‌های تجاری عرضه می‌نماید (۵).

Photina ترکیبی از دو فتوپروتئین ابلین و کلایتین[10] و c-Photina و i-Photina جهش یافته‌هایی از فتوپروتئین کلایتین هستند که i-Photina محصول جهش G142C و c-Photina نیز حاصل جهش در ۱۲ آمینواسید کلایتین است (۸-۶). در این تحقیق پس از مطالعات گسترده و مقایسه‌ای که بین این سه فتوپروتئین به عمل آمد، در نهایت فتوپروتئین i-Photina که نسبت به دو نوع دیگر دارای خصوصیات ارتقاء یافته‌تری بود، به منظور مطالعات بیشتر و مقایسه خصوصیات آن با اکورین و نیز استفاده از آن به‌عنوان یک گزارشگر در مطالعات آتی انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

- مواد

مارکرهای وزن مولکولی پروتئین (#SM۰۴۳۱) از شرکت Thermo scientific، ایمیدازول، بوریک اسید و کانامایسین از شرکت Bio Basic Canada INC، کیت استخراج پلاسمید GF-۱ و IPTG[11] از شرکت Vivantis، cp-coelenterazine از شرکت Resem، تریس، SDS[12]، کوماسی بلو

[1] Bioluminescence
[2] In vivo
[3] In vitro
[4] Coelenterazine
[5] Coelenterate
[6] Ctenophora
[7] Obelin
[8] Aequorin
[9] High-Throughput Screening

[10] Clytin
[11] Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
[12] Sodium dodecyl sulfate

G250 [13]و آگارز از شرکت Acros، ستون نیکل آگارز (Ni-NTA Agarose[14]) از شرکت Qiagen، Soy peptone از شرکت QUELAB، عصاره مخمر از شرکت Micromedia، و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت MERCK خریداری شد.

- طراحی و سنتز ژن

در راستای مقایسه‌ی خصوصیات بیولومینسانسی سه فتوپروتئین Photina، c-Photina و i-Photina و مطالعات بیوانفورماتیکی در نهایت پروتئین i-Photina به‌دلیل بالاتر بودن شدت سیگنال و پایداری نسبتاً مناسب آن، انتخاب شد. هدف تولید i-Photina در *E. coli* جهت تعیین خصوصیات بیولومینسانسی آن می‌باشد و چون توالی نوکلئوتیدی گزارش شده برای آن بر اساس ترجیح کدونی[15] در سلول‌های پستانداران تنظیم شده بود (۶)؛ ابتدا از طریق تطبیق[16] توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی i-Photina با توالی کلایتین، ابلین و اکورین و بررسی وجود کدون‌های کمیاب *E. coli* در توالی i-Photina و همچنین اطلاعات حاصل از چندین پایگاه داده بیوانفورماتیکی (۱۱-۹) مربوط به بهینه سازی کدونی، احتمال بیان شدن فتوپروتئین i-Photina در *E. coli* و سلول‌های پستانداران بررسی و تأیید شد. سپس جایگاه برش دو آنزیم محدود کننده *EcoR*I و *Not*I جهت واردکردن ژن i-Photina در وکتور pET۲۸a انتخاب و توالی مربوطه جهت سنتز به شرکت Shinegene (شانگهای، چین) فرستاده شد.

- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب

باکتری‌های *E. coli* سویه BL۲۱ (DE۳) حاوی پلاسمید i-Photina به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تلقیح و در دمای ۳۷ °C و با هوادهی مطلوب انکوبه شد. سپس ۲ میلی‌لیتر باکتری رشد کرده را به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انتقال داده و تا افزایش OD ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ در ۳۷ °C انکوبه شد. بهترین شرایط بیان برای i-Photina، دمای القاء ۲۶ °C، القاء با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG و مدت زمان القاء ۴ ساعت با هوادهی مطلوب (۲۵۰ rpm) مورد استفاده قرار گرفت. پس از بیان، محیط کشت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و رسوب باکتری به‌دست آمده با افزودن بافر لیزکننده به حالت سوسپانسیون درآمد و سپس از طریق سونیکاسیون لیز شد. پس از سانتریفیوژ سلول‌های لیز شده، مایع رویی جهت آنالیز بیان ژن بر روی ژل اکریل آمید برده شد. فتوپروتئین بیان شده بر روی وکتور pET۲۸a دارای دنباله His۶x-Tag است و بنابراین برای خالص کردن آن از ستون تمایلی نیکل آگارز استفاده شد. به منظور بررسی نحوه عملکرد ستون و درصد خلوص i-Photina، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های خالص شده به کمک ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد در شرایط احیایی (۱۲) بررسی و درجه خلوص آن تعیین شد. به منظور حذف اثر تداخلی ایمیدازول در سنجش عملکرد و ساختار پروتئین‌ها، نمونه‌ها دیالیز شدند. بدین منظور آپوفتوپروتئین خالص شده به‌مدت ۶ ساعت با فواصل ۲ ساعته در دمای ۴°C تحت دیالیز قرار گرفت. همچنین اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده از روش Bradford انجام شد (۱۳). بیان و تخلیص فتوپروتئین اکورین نیز که ژن کد کننده آن قبلاً توسط زین‌الدینی و

[13] Coomassie brilliant blue
[14] Nickel- nitrilotriacetic acid
[15] Codon usage
[16] Alignment

همکاران در pET۲۱a کلون شده بود به‌عنوان کنترل همزمان با i-Photina صورت گرفت (۱۴).

- تعیین خصوصیات فتوپروتئین i-Photina

- تهیه i-Photina نیمه سنتزی[17] و تعیین فعالیت بیولومینسانسی آن

i-Photina نوترکیب تخلیص شده (آپو i-Photina) جهت تولید نور بایستی تحت شرایط خاصی در محیط آزمایشگاه قرار گیرد تا مجدداً قابلیت تولید نور را پیدا کند. بدین‌منظور به آپو i-Photina در حضور بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار با pH۷/۶، کلنترازین با غلظت ۸ میکرومولار در حجم نهایی اضافه شد و در دمای ۴°C به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون در شرایط ذکر شده می‌توان از اصطلاح i-Photina نیمه سنتزی برای این فتوپروتئین استفاده کرد. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۴۰ میلی‌مولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار در pH۷/۶ به ۱۰ میکرولیتر از مخلوط فوق که با بافر تریس به حجم ۵۰ میکرولیتر رسیده بود، شدت لومینسانس اولیه با دستگاه بیولومینومتر اندازه‌گیری و با شدت سیگنال اکورین مقایسه شد.

- به‌دست آوردن بهترین زمان تولید i-Photina نیمه‌سنتزی و میزان ثبات فعالیت آن بر حسب زمان

به‌منظور تعیین بهترین زمان انکوباسیون i-Photina با کلنترازین جهت تولید i-Photina نیمه‌سنتزی و همچنین به‌دست آوردن میزان پایداری فعالیت آن بر حسب زمان در مقایسه با اکورین، مقدار مناسبی از i-Photina و اکورین با بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH۷/۶ حاوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار و کلنترازین ۸ میکرومولار، در دمای ۴°C انکوبه و در زمان‌های مختلف از آن برداشته و شدت لومینسانس نمونه‌ها با دستگاه بیولومینومتر اندازه‌گیری شد.

- بررسی میزان حساسیت به کلسیم

برای مشخص کردن میزان حساسیت فتوپروتئین‌های i-Photina و اکورین به کلسیم طبق روش ارائه شده به‌وسیله Inouye (۱۵)، با حل کردن فتوپروتئین در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۶ حاوی کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار، آلبومین سرم گاوی ۰/۱ درصد و ۰/۰۶ میلی‌مولار EDTA و کلنترازین ۸ میکرومولار انجام شد. پس از انکوباسیون در دمای ۴°C به‌مدت ۱۶ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده را به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم از غلظت $10^{-2/0}$ الی $10^{-7/0}$ مولار اضافه و فعالیت بیولومینسانسی فتوپروتئین با دستگاه بیولومینومتر اندازه‌گیری شد.

- تعیین حداکثر طیف نشر بیولومینسانسی i-Photina (λ_{max})

جهت تعیین λ_{max} بیولومینسانسی i-Photina و همچنین اکورین، نمونه‌ها در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH۷/۶) حاوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار و کلنترازین ۸ میکرومولار حل و در دمای ۴°C به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. با تزریق ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۴۰ میلی‌مولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH۷/۶) در ۵۰ میکرولیتر پروتئین انکوبه شده، λ_{max} توسط دستگاه synergy اندازه‌گیری شد.

- اندازه‌گیری فعالیت بیولومینسانسی علیه زمان

فعالیت بیولومینسانسی i-Photina و اکورین با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۴۰ میلی‌مولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH۷/۶ از طریق سیستم تزریق کننده دستگاه به ۵۰ میکرولیتر از i-Photina نیمه سنتزی در فاصله زمانی ۱۰ ثانیه با کمک دستگاه بیولومینومتر (Berthold Detection System/Orion II) خوانده شد.

[17] Semi-synthetic

یافته‌ها

- طراحی، سنتز، بیان و تخلیص فتوپروتئین i-Photina

پس از مقایسه توالی‌های آمینواسیدی i-Photina، کلایتین، ابلین و اکورین (شکل ۱) و همچنین بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن i-Photina جهت اطمینان از بیان آن در سلول‌های پستانداران و باکتری *E. coli* (۱۱-۹)؛ توالی مربوطه جهت سنتز ارسال و پس از آن در حامل بیانی pET۲۸a جاگذاری شد. بیان i-Photina در سلول‌های *E. coli* سویه BL۲۱ (DE۳) با استفاده از محیط کشت LB انجام شد؛ فتوپروتئین بیان شده بر روی وکتور pET۲۸a دارای دنباله His۶x–Tag است و بنابراین تخلیص پروتئین با ستون تمایلی نیکل آگارز انجام و با استفاده از SDS-PAGE آنالیز شد (شکل ۲).

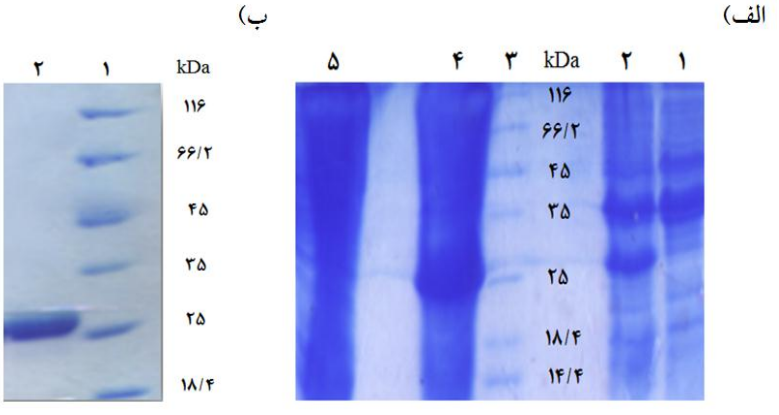
```
i-Photina       -MADTASKYAVKLRPNFDNPKWVNRHKFMFNFLDINGDGKITLDEIVSKASDDICAKLGA 59
clytin          -MADTASKYAVKLRPNFDNPKWVNRHKFMFNFLDINGDGKITLDEIVSKASDDICAKLGA 59
obelin          ----MSSKYAVKLKTDFDNPRWIKRHKHMFDFLDINGNGKITLDEIVSKASDDICAKLEA 56
aequorin        MLYDVPDYASLKLTSDFDNPRWIGRHKHMFNFLDVNHNGKISLDEMVYKASDIVINNLGA 60
                     ..  ::** .:****:*: ***.**:***:* :***:***:* **** :  :* *

i-Photina       TPEQTKRHQDAVEAFFKKIGMDYGKEVEFPAFVDGWKELANYDLKLWSQNKKSLIRDWGE 119
clytin          TPEQTKRHQDAVEAFFKKIGMDYGKEVEFPAFVDGWKELANYDLKLWSQNKKSLIRDWGE 119
obelin          TPEQTKRHQVCVEAFFRGCGMEYGKEIAFPQFLDGWKQLATSELKKWARNEPTLIREWGD 116
aequorin        TPEQAKRHKDAVEAFFGGAGMKYGVETDWPAYIEGWKKLATDELEKYAKNEPTLIRIWGD 120
                ****:***: .*****   **.** *  :* :::***:**. :*: :::*: :*** **:

i-Photina       AVFDIFDKDGSGSISLDEWKAYCRISGICSSDEDAEKTFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQHL 179
clytin          AVFDIFDKDGSGSISLDEWKAYGRISGICSSDEDAEKTFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQHL 179
obelin          AVFDIFDKDGSGTITLDEWKAYGKISGISPSQEDCEATFRHCDLDNSGDLDVDEMTRQHL 176
aequorin        ALFDIVDKDQNGAITLDEWKAYTKAAGIIQSSEDCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHL 180
                *:***.*** .*:*:******* : :**  *.**.* **: **:*:**.***********

i-Photina       GFWYTLDPNADGLYGNFVP- 198
clytin          GFWYTLDPNADGLYGNFVP- 198
obelin          GFWYTLDPEADGLYGNGVP- 195
aequorin        GFWYTMDPACEKLYGGAVP- 199
                *****:** .: ***. **
```

شکل ۱) تطبیق توالی‌های آمینواسیدی فتوپروتئین‌های i-Photina، کلایتین (عدد دسترسی[18]: Q08121)، ابلین (عدد دسترسی: Q27709) و اکورین (عدد دسترسی: Q6J4T7)؛ تنها آمینواسید متفاوت بین i-Photina و کلایتین با کادر قرمز نمایان شده است.



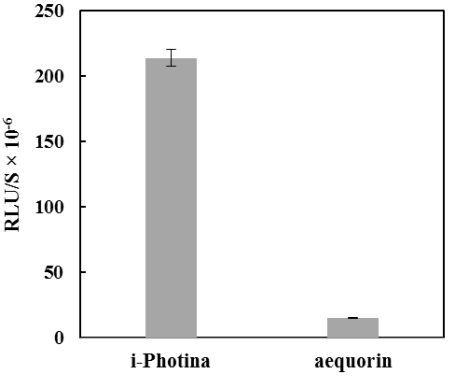
شکل ۲) ژل SDS پلی اکریل آمید مربوط به بیان (الف) و تخلیص (ب) i-Photina الف) ستون ۱ و ۲ به ترتیب محصول رویی حاصل از لیز سلول باکتری القا نشده و القا شده، ستون ۴ و ۵ به ترتیب رسوب حاصل از لیز سلول باکتری القا شده و القا نشده و ستون ۳ مربوط به مارکر وزن مولکولی می‌باشد؛ ب) ستون ۱ مارکر وزن مولکولی و ستون ۲، i-Photina تخلیص شده می‌باشد.

[18] Accession number

- تعیین خصوصیات فتوپروتئین i-Photina

- تهیه i-Photina نیمه سنتزی و تعیین فعالیت بیولومینسانسی آن

به‌منظور سنجش فعالیت بیولومینسانسی، محلول کلرید کلسیم ۴۰ میلی‌مولار به غلظت یکسانی از i-Photina و اکورین انکوبه شده با کلنترازین افزوده و فعالیت اولیه آن‌ها اندازه‌گیری شد. همان‌طور که از نتایج مشهود است شدت سیگنال اولیه i-Photina حدود ۱۴ برابر اکورین به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳) مقایسه فعالیت نسبی اکورین و i-Photina، میزان فعالیت ویژه محاسبه شده برای فتوپروتئین اکورین برابر (RLU per mg protein) ۲/۶۳×۱۰^۱۰ می‌باشد.

- به دست آوردن بهترین زمان تولید i-Photina نیمه سنتزی و میزان ثبات فعالیت آن بر حسب زمان

همان‌طور که در شکل ۴ الف نشان داده شده بهترین زمان برای انکوباسیون و تولید پروتئین نیمه سنتزی برای i-Photina و اکورین بین ۱۵ تا ۲۳ ساعت به‌دست آمد و همچنین هر دو پروتئین تا ۹۱ ساعت پس از انکوباسیون فعالیت قابل توجهی از خود نشان دادند.

- بررسی میزان حساسیت به کلسیم

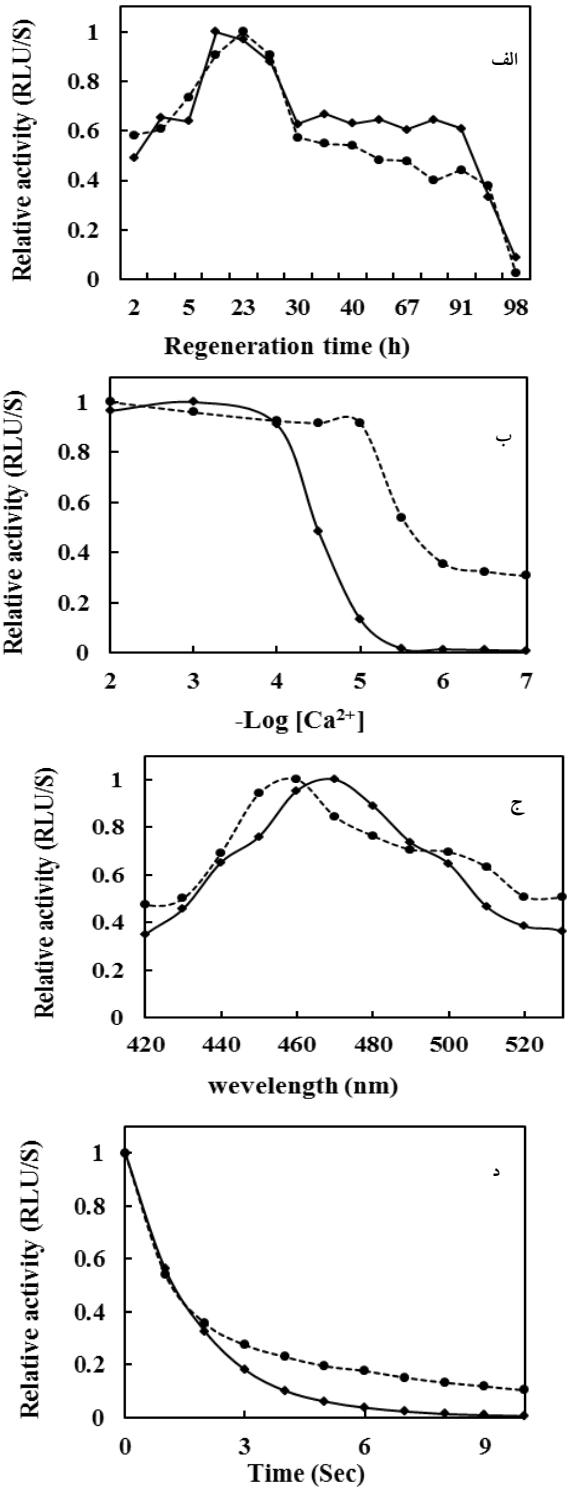
بررسی میزان حساسیت به کلسیم i-Photina و اکورین در غلظت‌های مختلف محلول کلرید کلسیم، از غلظت $۱۰^{-۲/۰}$ الی $۱۰^{-۷/۰}$ مولار، نشانگر تفاوت حساسیت به کلسیم این دو فتوپروتئین است. با توجه به شکل ۴ ب، میزان تشخیص کلسیم اکورین در دامنه $۱۰^{-۶/۰}$ الی $۱۰^{-۵/۰}$ مولار می‌باشد؛ اما منحنی حساسیت به کلسیم i-Photina به سمت غلظت‌های بالاتر ($۱۰^{-۵/۵}$ الی $۱۰^{-۴/۰}$) جابه‌جا شده است که نشان دهنده کاهش حساسیت آن به کلسیم در مقایسه با اکورین می‌باشد.

- تعیین حداکثر طول موج نشر بیولومینسانسی i-Photina (λ_{max})

همان‌طور که از شکل ۴ ج مشهود است λ_{max} i-Photina و اکورین به‌ترتیب ۴۷۰ و ۴۶۰ نانومتر می‌باشد.

- اندازه‌گیری فعالیت بیولومینسانسی علیه زمان

نمودار فعالیت فتوپروتئین‌ها علیه زمان در شکل ۴ د نشان داده شده است. سرعت کاهش فعالیت اکورین نسبت به i-Photina دارای آهنگ کندتری است و همان‌طور که مشهود است i-Photina در مقایسه با اکورین فعالیت خود را کمی سریع‌تر از دست می‌دهد.



شکل ۴) تعیین خصوصیات فتوپروتئین i-Photina و اکورین: خط پیوسته: i-Photina، خط چین: اکورین، الف) میزان ثبات فعالیت i-Photina و اکورین در طول زمان، ب) بررسی میزان حساسیت به کلسیم i-Photina و اکورین، ج) مقایسه طیف نشری i-Photina و اکورین، د) مقایسه سرعت خاموشی i-Photina و اکورین علیه زمان.

بحث

امروزه بیولومینسانس در گستره وسیعی از علوم و فناوری‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد و کاربردهای جدیدی از سیستم‌های بیولومینسانس به‌ویژه فتوپروتئین‌ها در حال شکل‌گیری و گسترش می‌باشد. جالب توجه است که ویژگی‌های معین و منحصر به فرد فتوپروتئین‌ها از قبیل حساسیت بالای ردیابی، کاربرد بی‌خطر و آسان، عدم سمیت سلولی، ماهیت غیرتهاجمی، سیگنال کم پس زمینه‌ای و غیره آن‌ها را به آنالیزورهای بسیار عالی جهت جایگزینی ترکیبات پرتوزا[19] و ترکیبات فلورسنت تبدیل کرده است (۱۶).

در این راستا تحقیقات گسترده مولکولی جهت بهینه کردن خصوصیات نشری آن‌ها به‌طور مستمر و متعدد انجام می‌شود (۱۷ و ۱۸). اکثر این تحقیقات روی فتوپروتئین‌های وابسته به کلسیم از خانواده کیسه تنان به ویژه ابلین و اکورین متمرکز شده است (۱۹ و ۲۰).

اکورین جهت سنجش فعالیت بسیاری از GPCRs[20] و کانال‌های کلسیمی[21] کاربرد فراوانی دارد، با وجود این اکورین در سنجش‌های HTS به دو دلیل چندان کارآمد نیست: ۱- پایین بودن بهره‌ی کوانتومی آن ۲- بالا بودن سرعت خاموشی آن؛ بنابراین تولید فتوپروتئین‌هایی با قابلیت ایجاد سیگنال شدیدتر در زمان طولانی‌تر، می‌تواند نقش مؤثری در بهبود حساسیت و کاربرد فتوپروتئین‌ها در سنجش‌های HTS ایفا نماید.

در راستای این هدف در سال ۲۰۰۴ شرکت Axxam ایتالیا سه فتوپروتئین به نام‌های Photina، i-Photina و c-Photina تولید کرد که با توجه به بالاتر و درعین‌حال دائمی‌تر بودن سیگنال آن‌ها در مقایسه با اکورین از جایگاه ویژه‌ای در سنجش‌های HTS برخوردار شده‌اند

[19] Radioactive
[20] G Protein–Coupled Receptors
[21] Ca^{2+} channels

(۲۱ و ۲۲). فتوپروتئین Photina از ترکیب دو فتوپروتئین ابلین و کلایتین (جایگزینی توالی آمینواسیدی بین EF-Hand I و EF-Hand II در ابلین (توالی بین ۹۴–۵۰) با توالی متناظر آن در کلایتین (توالی بین ۹۷–۵۳) تولید شده است (۴) و فتوپروتئین‌های i-Photina و c-Photina جهش یافته‌هایی از فتوپروتئین کلایتین هستند. i-Photina محصول جهش در موقعیت گلیسین ۱۴۲ به سیستئین، و فتوپروتئین c-Photina نیز حاصل جهش در۱۲ آمینواسید کلایتین (شامل G۵۸E، D۶۹V، A۷۰C، K۷۶R، K۷۷G، I۷۸C، D۸۱E، V۸۶I، E۸۷A، A۹۰Q، V۹۲L، E۹۷Q) می‌باشد؛ به‌طوری که دو فتوپروتئین i-Photina و c-Photina نسبت به Photina افزایش در شدت نشر بیولومینسانس نشان دادند (۸). در حال حاضر فرم تجاری این سه فتوپروتئین در قالب کیت‌ها و رده‌های سلولی تشخیصی در زمینه‌هایی چون بیوشیمی، پزشکی، کشف دارو، دانش‌های محیطی و آنالیزی توسط شرکت‌های مختلفی از جمله PerkinElmer آمریکا عرضه می‌شود (۵).

در این تحقیق با توجه به مطالب عنوان شده پس از مطالعات گسترده بیوانفورماتیکی و مقایسه خصوصیات این سه فتوپروتئین در نهایت فتوپروتئین i-Photina به دلیل بالاتر بودن شدت سیگنال و همچنین پایداری مناسب آن نسبت به دو فتوپروتئین دیگر و اکورین به‌منظور به‌دست آوردن شرایط بهینه تولید و مقایسه خصوصیات بیولومینسانسی آن با فتوپروتئین اکورین انتخاب شد (شکل ۱). با توجه به اینکه توالی نوکلئوتیدی گزارش شده برای i-Photina بر اساس ترجیح کدونی در سلول‌های پستانداران تنظیم شده بود؛ ابتدا از عدم وجود کدون‌های کمیاب *E. coli* در توالی i-Photina اطمینان حاصل شد (۱۱–۹). سپس توالی مربوطه جهت سنتز و قرار دادن در حامل بیانی pET۲۸a به شرکت Shinegene (شانگهای، چین) ارسال شد. جهت بررسی فعالیت و تعیین ویژگی‌های فتوپروتئین، بیان در سلول‌های *E. coli* سویه (DE۳) BL۲۱ با استفاده از محیط کشت LB صورت گرفت. پس از بیان به‌دلیل وجود دنباله‌ی هیستیدینی در فتوپروتئین، پروتئین طی یک مرحله با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی با درصد خلوص بالا تخلیص شد. براساس آنالیز SDS-PAGE، در نهایت یک باند پروتئینی در ناحیه حدود ۲۵ کیلودالتون معادل وزن مولکولی پروتئین ظاهر شد (شکل ۲). به‌منظور حذف ایمیدازول نیز نمونه‌ی پروتئینی تحت دیالیز قرار گرفت. سپس جهت ایجاد پروتئین نیمه سنتزی، از غلظت‌های یکسان i-Photina و اکورین استفاده شد. بررسی اولیه نتایج فعالیت بیولومینسانسی i-Photina و اکورین، نشانگر حدود ۱۴ برابر بودن شدت سیگنال i-Photina نسبت به اکورین است (شکل ۳).

با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان ثبات فعالیت هر دو فتوپروتئین در طول زمان نزدیک به ۹۱ ساعت و همچنین بهترین زمان برای انکوباسیون آن‌ها با سوبسترا ۲۳–۱۵ ساعت به‌دست آمد (شکل ۴ الف). بررسی نتایج میزان حساسیت به یون کلسیم فتوپروتئین‌های i-Photina و اکورین (شکل ۴ ب)، حاکی از تفاوت در حساسیت به یون کلسیم این دو فتوپروتئین می‌باشد.

منحنی حساسیت به یون کلسیم در i-Photina به سمت غلظت‌های بالاتر جابه‌جا شده است که نشان دهنده کمتر بودن حساسیت آن به یون کلسیم در مقایسه با اکورین می‌باشد. در ضمن، منحنی‌های مربوطه برای هر دو فتوپروتئین به شکل سیگموئیدی است که نشانگر رابطه تعاونی بین لوپ‌ها در اتصال به یون کلسیم می‌باشد. بررسی سرعت خاموشی i-Photina و اکورین نشان داد که سرعت کاهش فعالیت در i-Photina نسبت به

اکورین بیشتر است و در مقایسه با اکورین فعالیت خود را کمی سریع‌تر از دست می‌دهد (شکل ۴ د). همچنین مقایسه طیف نشری این دو فتوپروتئین نشان‌دهنده‌ی نزدیک بودن λ_{max} نشری این دو فتوپروتئین با اختلاف ۱۰ نانومتر می‌باشد (شکل ۴ ج). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت خصوصیات بیولومومینسانسی فتوپروتئین i-Photina بسیار شبیه به فتوپروتئین اکورین می‌باشد، با این تفاوت که شدت سیگنال آن نزدیک به ۱۴ برابر شدت سیگنال اکورین و همچنین حساسیت به یون کلسیم آن نزدیک به ۵ برابر کم‌تر از اکورین می‌باشد.

بنابراین i-Photina جایگزینی مناسب برای اکورین در سنجش‌های HTS بوده و بنابراین می‌تواند جهت بهبود بیشتر خصوصیات بیولومینسانسی آن به‌ویژه کاهش سرعت خاموشی و همچنین افزایش حساسیت به یون کلسیم مطرح گردد.

سپاس و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

References:

1.Chen L, Jin L, Zhou N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery. Expert Opin Drug Discov 2012; 7: 791-806.
2.Deng L, Markova SV, Vysotski ES, et al. Crystal structure of a Ca^{2+}-discharged photoprotein implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence. J Biol Chem 2004; 279: 33647-52.
3.Vysotski ES, Lee J. Ca^{2+}-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism. Acc Chem Res 2004; 37: 405-15.
4.Bovolenta S, Foti M, Lohmer S, et al. Development of a Ca^{2+}-activated photoprotein, Photinia, and its application to high-throughput screening. J Biomol Screen 2007; 12: 694-704.
5.Comley J. Dispense & imaging assays-moving towards a more balanced use of both fluorescence and flash luminescent readouts. Drug discovery world: DDW 2008; 9: 39.
6. Mastroianni N, Cainarca S, Corazza S. Photoproteins with enhanced bioluminescence and assays using the same. EP Patent 1,858,921; 2009.
7.Cainarca S, Fenu S, Ferri C, et al. A photoprotein in mouse embryonic stem cells measures Ca^{2+} mobilization in cells and in animals. PloS one 2010; 5: e8882.
8.Nucci C, Corazza S, Lohmer S, et al. Luminescent transgenic non human animals, progeny, cell derivatives and uses thereof. EP Patent 1,973,937; 2011.
9.graphical codon usage analyser. (Accessed 22 October, 2012, at http://gcua.schoedl.de/seqoverall_v2.html.)
10.*E. coli* Codon Usage Analysis 2.0. (Accessed 22 October, 2012, at http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.html.)
11.GenScript, Rare Codon Analysis Tool. (Accessed 22 October, 2012, at http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis.)
12.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.
13.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 7: 248-54.
14.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.
15.Inouye S, Sahara Y. Expression, purification and characterization of a photoprotein, clytin, from Clytia gregarium. Protein Expr Purif 2007; 53: 384-9.
16.Dikici E, Qu X, Rowe L, et al. Aequorin variants with improved bioluminescence properties. Protein Eng Des Sel 2009; 1-6.
17.Rowe L, Dikici E, Daunert S. Engineering bioluminescent proteins: expanding their analytical potential. Anal Chem 2009; 81: 8662-8.

18.Deo SK, Lewis JC, Daunert S. Bioluminescence detection of proteolytic bond cleavage by using recombinant aequorin. Anal Biochem 2000; 281: 87-94.
19.Markova SV, Vysotski ES, Blinks JR, et al. Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca^{2+}-regulated photoproteins. Biochemistry 2002; 41: 2227-36.
20.Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, et al. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. Biochem J 2001; 355: 1-12.
21.Comley J. Changing dynamics in dispense and imaging assays. Drug discovery world: DDW 2006; 7: 35.
22.Eglen RM, Reisine T. Photoproteins: important new tools in drug discovery. Assay Drug Dev Technol 2008; 6: 659-72.

ISMJ 2015; 18(3): 497-507

Original Article

Expression and Characterization of i-Photina as an Efficient Photoprotein

F. Ahmadi [1], R. H. Sajedi [2*], M. Zeinoddini [3]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[2] Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

(Received 27 Nov, 2013 Accepted 17 Mar, 2014)

Abstract

Background: Nowadays photoproteins are excellent reporter systems as they have virtually no background. The most commonly studied photoprotein is aequorin. But because of it's low quantum yield and very fast reaction kinetic; this photoprotein assay don't adapt for High-Throughput Screening (HTS). Consequently, some researchers developed three improved photoproteins optimized for the generation of precise Ca^{2+} mobilization assays; photina, i-photina and c-photina. Although the total light release of these photoproteins is greater and their reaction kinetic is slower compared to other existing photoproteins, opening new opportunities for the application of flash luminescence assays in HTS. Recently, the three photoproteins by several companies such as PerkinElmer and Axxam have been commercialized. So, we selected i-photina which has the highest luminescence signal and good stability compared with two other photoproteins.

Materials and Methods : Codon usage of i-Photina was optimized for both *E. coli* and mammalian cells. The encoding gene of i-photina was synthesized and overexpressed in *E. coli*. Then i-Photina was characterized and compared with aequorin.

Results: i-Photina showed about a 14-fold higher bioluminescence signal than aequorin. Ca^{2+} sensivity of i-Photina was found to be slightly less than aequorin. In respect to other measured properties such as degree of stability, bioluminescence spectrum and decay half-life time, these two photoproteins were almost the same.

Conclusion: i-Photina is an improved version of photoprotein that in many ways is superior to use of other Ca^{2+} indicators for HTS assays and can also be considered as a potential candidate for creating genetic mutations improved the bioluminescence propertises.

Key words: photoprotein, i-Photina, bioluminescence signal intensity, HTS (High-Throughput Screening)

***Address for correspondence*: Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: sajedi-r@modares.ac.ir