زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 3، ویژه‌نامه 1395

مطالعه طیف‌سنجی دئوکسی ریبوزیم محدود کننده: بررسی ساختار و فعالیت

مهدی صادقی[1]، بیژن رنجبر[2*]، محمدرضا گنجعلی خانی[3]
1- دانشجوی دکتری، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2- استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
3- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

* تهران، صندوق پستی 175-14115
ranjbarb@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/2/13 پذیرش مقاله: 95/1/17)

چکیده- دئوکسی ریبوزیم محدود کننده وابسته به کوفاکتور مس از منحصر به‌فردترین دئوکسی ریبوزیم‌های شناخته شده می‌باشد. ویژگی این آنزیم برش اختصاصی تک رشته DNA و تشکیل ساختار DNA سه رشته است که برای شناسایی سوبسترا ضروری می‌باشد. روش معمول برای سنجش فعالیت دئوکسی ریبوزیم‌ها (با سوبسترای اسیدنوکلئیکی) بر پایه استفاده از سوبستراهای نشاندار رادیواکتیو می‌باشد که دارای پیچیدگی‌ها و مشکلاتی است. در مطالعه حاضر، با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس خارجی و جذب فرابنفش، روش‌هایی دقیق، سریع و ارزان برای مطالعه فعالیت آنزیم ارائه شده است. با توجه به اهمیت کلیدی ساختار این آنزیم در شناسایی و اتصال به سوبسترا با تشکیل ساختار سه رشته‌ای DNA، برای مطالعه ساختاری آنزیم از روش طیف‌سنجی دو رنگ نمایی دورانی استفاده شد. طیف‌های به دست آمده از این روش نشان دهنده تغییرات ساختاری و شاهدی بر تشکیل DNA سه رشته در کمپلکس آنزیم-سوبسترا است. نشانگر سایبرگولد دارای تمایل بالای اتصال به DNA دو رشته در مقایسه با DNA تک رشته است. از تغییرات نشر فلورسانس سایبرگولد بعد از افزودن کوفاکتور به کمپلکس آنزیم-سوبسترا می‌توان میزان فعالیت آنزیم را سنجید. در روش سنجش پررنگ شدگی پیوسته که بر پایه طیف‌سنجی فرابنفش است از پررنگ شدگی ایجاد شده پس از افزودن کوفاکتور به کمپلکس آنزیم-سوبسترا برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شده است. نتایج نشان دهنده دقت بالای روش سنجش پررنگ شدگی نسبت به طیف‌سنجی فلورسانس خارجی است، به این دلیل که روش سنجش پررنگ شدگی بر پایه استفاده از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی DNA و بدون دخالت عوامل خارجی می‌باشد.

کلید واژگان: دئوکسی ریبوزیم محدود کننده، فلورسانس خارجی، سنجش پررنگ شدگی پیوسته، دورنگ نمایی دورانی.

1- مقدمه

در دهه‌های اخیر به واسطه استفاده از روش‌های انتخاب آزمایشگاهی[1] ساختارهای DNA کاتالیستی شناسایی

[1] In vitro selection

شده‌اند که به این مولکول‌های DNA اصطلاحاً دئوکسی ریبوزیم گفته می‌شود [1]. دئوکسی ریبوزیم محدود کننده وابسته به کوفاکتور مس[1] یکی از دئوکسی ریبوزیم‌های منحصر به‌فرد است که به واسطه برش اختصاصی DNA تک رشته‌ای به عنوان یک دئوکسی ریبوزیم محدودکننده مطرح می‌باشد. این آنزیم دارای دو بازوی اتصالی است که به وسیله این بازوهای اتصالی، به سوبسترای خود متصل می‌شود. این بازوهای اتصالی می‌توانند دارای طول و ترکیب بازی متفاوتی، متناسب با سوبسترای خود باشند. این آنزیم علاوه بر بازوی اتصالی خود دارای یک هسته کاتالیتیک است که فرایند واکنش را انجام می‌دهد. واکنش آنزیمی وابسته به حضور کوفاکتور مس دو ظرفیتی می‌باشد. این دئوکسی ریبوزیم توسط R.R. Breaker شناسایی شده است [3،2] (شکل 1).

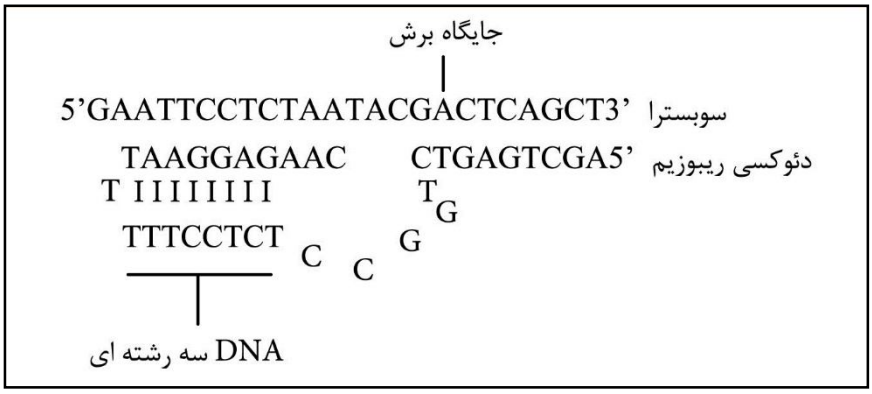
در واکنش انجام شده، دئوکسی ریبوزیم از طریق تشکیل بازوهای دور شته‌ای و سه رشته‌ای به سوبسترا متصل می‌شود (شکل 2). نکته مهمی که در مورد این دئوکسی ریبوزیم وجود دارد و منحصر به این آنزیم می‌شود تشکیل DNA سه رشته در کمپلکس آنزیم سوبسترا می‌باشد که تشکیل این ساختار برای برش سوبسترا به وسیله آنزیم ضروری است [4] (شکل 1). بعد از افزودن کوفاکتور به کمپلکس آنزیم-سوبسترا، واکنش آنزیمی شروع می‌شود و محصولات واکنش که DNA های تک رشته‌ای هستند از دئوکسی ریبوزیم جدا می‌شوند (شکل 2).

دئوکسی ریبوزیم محدود کننده دارای کاربردهای فراوان در نانو زیست فناوری[2]، ساخت حسگرهای زیستی[3] و همچنین در توسعه ابزارهای محاسبه‌گر زیستی[4] در ابعاد مولکولی است [6،5]. کاربرد اصلی این دئوکسی ریبوزیم در ساخت حسگرهای زیستی با حساسیت بالا برای شناسایی عنصر مس می‌باشد [7-9]. همچنین به صورت ترکیبی با آپتامرهای دیگر می‌توان از آن برای شناسایی زیست مولکول‌ها استفاده کرد [10]. در راستای کاربردهای چندگانه دئوکسی ریبوزیم محدودکننده، یکی از نیازها ارائه روش یا تکنیکی برای بررسی و مطالعه کینتیکی سریع و دقیق این آنزیم در شرایط مختلف است. در حالی که بسیاری از واکنش‌های دئوکسی ریبوزیم‌های شناخته شده بر روی سوبستراهایی از جنس اسیدنوکلئیک انجام می‌شود ولی روش‌های مورد استفاده برای مطالعات کینتیکی از لحاظ تکنیکی، دسترسی آسان و هزینه، دارای مشکلاتی می‌باشند.

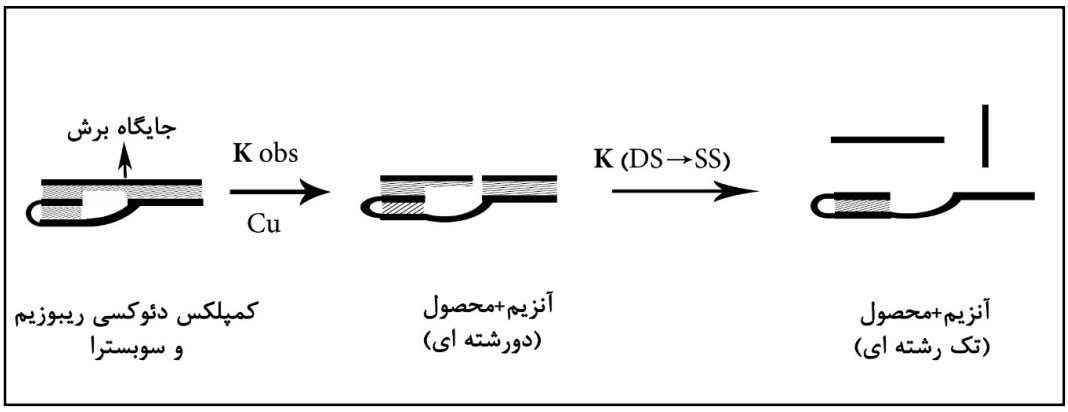
پرکاربردترین روش اندازه‌گیری کینتیک واکنش‌های دئوکسی ریبوزیم با استفاده از سوبستراهای نشاندار رادیواکتیو می‌باشد. این روش نیازمند نمونه برداری‌های طاقت فرسا، جدا سازی بر اساس الکتروفورز و اندازه-گیری محصولات حاصل از واکنش است. در طی این فرایند طولانی مقداری از سوبستراها در طی زمان آزمایش، فعالیت رادیواکتیو خود را از دست می‌دهند که این امر دقت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به هر حال این روش برای مطالعه واکنش دئوکسی ریبوزیم‌هایی با نیمه عمری کمتر از چند دقیقه مناسب نیست.

یک روش جایگزین برای روش بالا استفاده از تکنیک FRET با به کارگیری سوبستراهای نشاندار با رنگ فلورسانت است. با استفاده از این تکنیک می‌توان اندازه‌گیری‌های کینتیک را به صورت پیوسته انجام داد [11]. با این وجود سنتز سوبستراهای با رنگ فلورسانت نشاندار، استفاده از این تکنیک را به عنوان روشی گران محدود می‌کند. همچنین امکان این که گروه‌های فلورسانت بزرگ در رفتار کینتیکی آنزیم اختلال ایجاد کند نیز از محدودیت‌های دیگر استفاده از این روش است [12].

[1] Cu dependent restriction deoxyribozyme
[2] Nanobiotechnology
[3] Biosensors
[4] Biocomputing



شکل 1 ساختار اول و دوم کمپلکس دئوکسی ریبوزیم محدودکننده با سوبسترا. دئوکسی ریبوزیم محدود کننده (توالی با حروف پررنگ) از طریق دو بازوی اتصالی خود به سوبسترا (توالی با حروف کم رنگ) متصل می‌شود. اتصال بازوی دو رشته‌ای از طریق پیوندهای هیدروژنی واتسون کریکی و اتصال بازوی سه رشته‌ای از طریق پیوندهای هیدروژنی هاگستینی اتفاق می‌افتد. پس از اتصال، با افزودن کوفاکتور آنزیم، سوبسترا در جایگاه مشخص شده در شکل برش می‌خورد.



شکل 2 شکل شماتیک مربوط به واکنش انجام شده توسط دئوکسی ریبوزیم محدود کننده. اتصال DNA کاتالیتیک (رشته ضخیم) به سوبسترا (رشته باریک) از طریق پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها اتفاق می‌افتد. (DS = دو رشته‌ای، SS = تک رشته‌ای)

در اینجا دو روش اندازه‌گیری پیوسته با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی گزارش شده که برای اندازه‌گیری سرعت کینتیکی واکنش‌های کاتالیز شده توسط دئوکسی ریبوزیم محدودکننده بکار گرفته شده است. نتایج به دست آمده از این روش‌ها نشان می‌دهد که سرعت واکنش آنزیمی محاسبه شده از این روش با سرعت‌های محاسبه شده از روش‌های مرسوم مطابقت می‌کند. در عین حال این روش ها در مقایسه با سایر روش‌ها سریع‌تر، قابل دسترس‌تر و از لحاظ اقتصادی به صرفه‌تر می‌باشند. روش اول برای مطالعه کینتیکی استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس خارجی با استفاده از نشانگر سایبر گولد است. این نشانگر تمایل بالایی برای اتصال به DNA دو رشته‌ای در مقایسه با DNA تک رشته‌ای دارد [13]. راه کار دوم، استفاده از روش سنجش پررنگ شدگی پیوسته[1] (CHA) است. روش CHA که بر پایه طیف‌سنجی فرابنفش است، از ویژگی‌های متفاوت فیزیکوشیمیایی دئوکسی-ریبونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای و دور شته‌ای بهره می‌برد [14]. برای مطالعه ساختاری نیز از روش طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی استفاده شد که نتایج حاصل از این

[1] Continuous Hyperchromicity Assay (CHA)

روش تأیید کننده تشکیل DNA سه رشته‌ای در کمپلکس آنزیم-سوبسترا است.

نتایج ارائه شده در این مقاله علاوه بر تأیید مستقیم تشکیل ساختار سه رشته‌ای DNA در کمپلکس آنزیم-سوبسترا، روش‌های جدیدی بر پایه تکنیک‌های طیف‌سنجی فرابنفش و فلورسانس ارائه می‌کند. به نظر می‌رسد این روش‌ها در بیشتر موارد می‌تواند یک جایگزین مطمئن و مفید برای روش‌های رایج برای اندازه‌گیری فعالیت دئوکسی ریبوزیم محدودکننده و حتی سایر دئوکسی ریبوزیم هایی باشد که دارای سوبسترای اسیدنوکلئیکی هستند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این تحقیق با درجه‌ی خلوص PAGE از شرکت بایونیر[1] خریداری شد. NaCl، KCl، $CuCl_2$ و HEPES که دارای درجه‌ی خلوص بیولوژی هستند، از شرکت سیگما[2] خریداری شد. سایبر گولد مورد استفاده در آزمایش از شرکت Molecular Probes (Eugene, OR) خریداری شد. همه‌ی شیشه‌های مورد استفاده در آزمایش، قبل از استفاده توسط محلولی از اسید کلریدریک (HCl) و اسید نیتریک (HNO_3) (با نسبت حجمی HCl/HNO_3=1:3) تمیز شده و پس از شستشوی آن‌ها با استفاده از آب دیونیزه مورد استفاده قرار گرفتند.

2-2- آماده‌سازی محلول دئوکسی ریبوزیم

برای تشکیل دئوکسی ریبوزیم محدودکننده وابسته به مس، آنزیم و سوبسترا به مقدار مشخص در بافر محتوی HEPES 50 mM، NaCl 0.5 M و KCl در pH 7.0 حل شد. برای تشکیل کمپلکس آنزیم-سوبسترا محلول تا دمای 95 درجه سانتی‌گراد برای 1 دقیقه حرارت داده شد و سپس اجازه داده شد به صورت طبیعی تا دمای محیط خنک شود [15]. واکنش آنزیمی بعد از افزودن کوفاکتور مس به کوکتل آغاز گردید.

2-3- طراحی آزمایش بر اساس حضور سایبر گولد در محیط واکنش

سایبر گولد یک رنگ جدید فلورسانت برای رنگ‌آمیزی و شناسایی DNA می‌باشد که مثل اتیدیم برماید دارای تمایل بالا برای اتصال به DNA دو رشته‌ای در مقایسه با DNA تک رشته‌ای است. بازده فلورسانت سایبر گولد هنگامی که به مولکول DNA متصل می‌شود، نسبت به حالت آزاد 1000 برابر قوی‌تر است که این عدد برای اتیدیم بروماید تنها 10 برابر می‌باشد که نشان دهنده حساسیت فوق‌العاده بالای سایبر گولد است [13]. با توجه به حساسیت بالا و همچنین نداشتن اثر سرطان‌زایی برای سایبر گولد می‌توان در مطالعات وسیع کینتیک آنزیمی، که همراه با تشکیل یا از بین رفتن ساختارهای DNA دور شته‌ای است، به جای اتیدیم بروماید از آن استفاده کرد.

همان‌گونه که در مقدمه هم عنوان شده است، دئوکسی ریبوزیم از طریق تشکیل بازوهای دو رشته‌ای و سه رشته‌ای به سوبسترا متصل می‌شود (شکل 2). بعد از افزودن کوفاکتور به کمپلکس آنزیم-سوبسترا، واکنش آنزیمی شروع می‌شود و سوبسترا برش می‌خورد که این امر باعث از بین رفتن ساختارهای DNA دور شته‌ای می‌شود (شکل 2). بنابراین از افزایش شدت فلورسانس، ناشی از اتصال سایبر گولد به بازوهای DNA دور شته‌ای، و کاهش شدت آن، در پی جدا شدن سایبر گولد از DNA، می‌توان برای مشاهده تشکیل کمپلکس دئوکسی ریبوزیم-سوبسترا و رها شدن محصول واکنش استفاده کرد. در بیشتر مواقع، فرایند رها شدن سوبسترا از آنزیم

[1] Bioneer Corporation
[2] Sigma Co

بسیار سریع‌تر از واکنش برش اکسیداتیو آنزیم می‌باشد، به طوری که سرعت جدا شدن محصول از آنزیم منعکس کننده سرعت برش سوبسترا است [3].

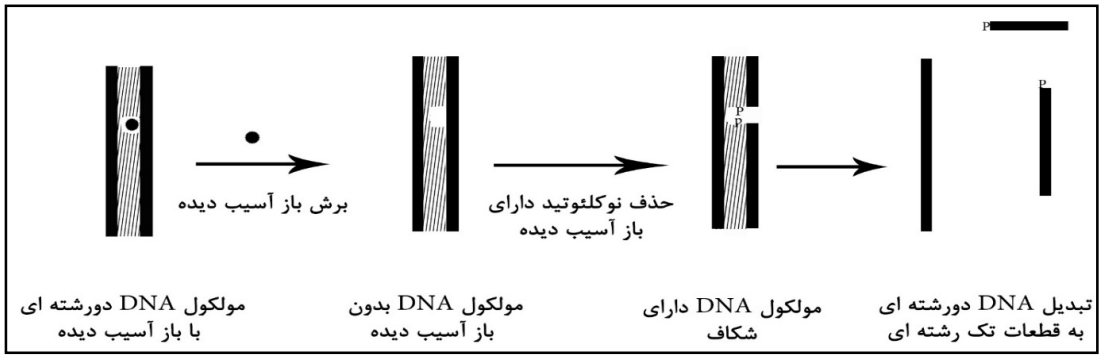
برای اینکه سایبر گولد به عنوان یک نشانگر مطمئن برای اندازه‌گیری سرعت برش سوبسترا باشد، چند ملاک باید رعایت شود. اول اینکه حضور سایبر گولد نباید مراحلی که اندازه‌گیری می‌شوند، مثل برش سوبسترا یا رها شدن محصولات را تحت تأثیر قرار دهد. برای مهار این امر باید از آزمایش‌های کنترل استفاده نمود. به هر حال با توجه به استفاده میزان خیلی کم از سایبر گولد نسبت به مواد واکنش گر، اثر مهار کنندگی آن اصولاً قابل چشم‌پوشی است. نکته دوم در نظر گرفتن غلظت مناسب دئوکسی ریبوزیم و سوبسترا به منظور دست‌یابی به بیشترین حساسیت سایبر گولد است که در بخش 2-3 به آن پرداخته شده است. نکته سوم، سرعت اتصال و جدا شدن سایبر گولد باید خیلی بالاتر از سرعت اتصال آنزیم-سوبسترا و جدا شدن محصول از آنزیم باشد، به طوری که محدودیتی در اندازه‌گیری‌ها ایجاد نکند.

2-4- اندازه‌گیری فلورسانس

اندازه‌گیری طیف نشری برای واکنش دئوکسی ریبوزیم توسط دستگاه فلورسانس Perkin Elmer انجام شد. آزمایش با استفاده از یک کووت کوارتز استاندارد (حجم کل 1 میلی‌لیتر) انجام گردید. طول موج جذبی برای سایبر گولد 495 نانومتر و طول موج نشری 537 نانومتر می‌باشد. بررسی فعالیت آنزیمی، در دمای 23 درجه سانتی‌گراد در حضور غلظت 1X سایبر گولد تهیه شده از محلول استوک 1000X انجام شد. مطالعات کینتیکی واکنش به منظور مقایسه با داده‌های منتشر شده، در غلظت آنزیم و سوبسترا 1 میکرومولار انجام شد. برای تحلیل کینتیکی، نمودارهای بدست آمده از اندازه‌گیری‌های فلورسانس با استفاده از نرم‌افزار GraFit روی توابع کینتیکی مناسب قرار داده شد.

2-5- طراحی آزمایش بر اساس روش سنجش پررنگ شدگی پیوسته (CHA)

روش CHA که بر پایه طیف‌سنجی فرابنفش است، از ویژگی‌های متفاوت فیزیکوشیمیایی دئوکسی-ریبونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای و دور شته‌ای بهره می‌برد. به این صورت که پررنگی DNA مشاهده شده در طول موج 260 نانومتر می‌تواند به عنوان یک گزارشگر دقیق برای واکنش آنزیمی عمل کند که طی آن DNA دو رشته-ای به DNA تک رشته‌ای تبدیل می‌شود. افزایش مشاهده شده در جذب طول موج 260 نانومتر متناسب با تشکیل محصول است که هم‌زمان با از بین رفتن ساختارهای دو رشته‌ای DNA انجام می‌شود. مثالی از کاربرد این روش، حذف بازهای آسیب دیده از DNA دور شته‌ای توسط آنزیم‌های ترمیمی است(طی فرایندهای ترمیمی BER و NER) که باعث شکست در زنجیره‌ی قند-فسفات مولکول DNA می‌شود. این شکست باعث می‌شود مولکول DNA دور شته‌ای پایداری لازم برای حفظ ساختار خود به صورت مولکول دو رشته‌ای را از دست داده و تبدیل به سه مولکول DNA تک رشته‌ای شود. مطابق شکل 3 در پی این اتفاق می‌توان در محلول واکنش شاهد افزایش جذب در طول موج260 نانومتر و پدیده‌ی پررنگی DNA بود. پررنگی مشاهده شده در طول موج 260 نانومتر طی زمان، به عنوان یک گزارشگر دقیق برای سرعت واکنش آنزیمی است که متناسب با تشکیل محصول و هم‌زمان با از بین رفتن ساختار دو رشته‌ای قابل مشاهده است. در مدلی که به عنوان کنترل برای تأیید صحت روش CHA ساخته شد، تشکیل محصول توسط آنزیم شبیه‌سازی گردید. این مدل آشکار می‌سازد روش CHA به صورت انتخابی و کمی محدوده‌ی تغییرات پررنگی که منعکس کننده‌ی سرعت تشکیل محصول است را نشان می‌دهد. از این روش به صورت گسترده می‌توان برای مطالعه‌ی آنزیم‌هایی با توانایی برش اختصاصی DNA استفاده کرد [14].



شکل 3 شکل شماتیک از فرایند ترمیم DNA آسیب دیده و تشکیل DNA تک رشته بعد از عملکرد آنزیم‌های ترمیمی. طی این فرایند میزان جذب در طول موج 260 نانومتر به دنبال پررنگی DNA افزایش می‌یابد، که می‌تواند به عنوان یک گزارشگر دقیق، برای عملکرد آنزیم‌هایی مانند آنزیم‌های ترمیم DNA باشد.

با توجه به مطالب عنوان شده مشخص است که می‌توان از روش CHA برای مطالعه‌ی کینتیکی دئوکسی ریبوزیم محدودکننده استفاده کرد. همان‌گونه که در شکل 2 مشاهده می‌شود، واکنش کاتالیتیکی دئوکسی ریبوزیم با تشکیل قطعات کوچک DNA تک رشته‌ای همراه است که هم‌زمان با از بین رفتن ساختارهای دو رشته‌ای تشکیل شده در کمپلکس آنزیم-سوبسترا می‌باشد.

2-6- اندازه‌گیری طیف جذبی فرابنفش

طیف جذبی فرابنفش محلول واکنش دئوکسی ریبوزیم محدودکننده برای بررسی فعالیت آنزیمی در طول موج 260 نانومتر اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری توسط دستگاه طیف سنج جذبی Perkin Elmer صورت گرفت. کینتیک واکنش برای دئوکسی ریبوزیم محدودکننده با اندازه‌گیری طیف جذبی در طول موج 260 نانومتر در دمای 23 درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تحلیل نمودارهای بدست آمده از نرم افزار GraFit استفاده شد.

2-7- اندازه‌گیری طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی[1] (CD)

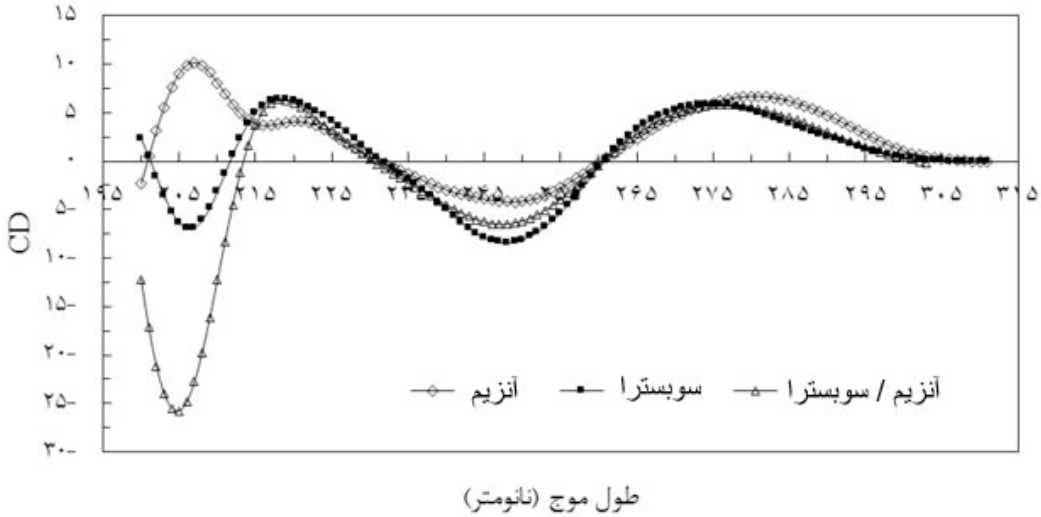
نمونه‌هایی که برای طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی آماده شدند شامل دئوکسی ریبوزیم، سوبسترا و کمپلکس آنزیم-سوبسترا بود که در بافر HEPES 50 mM، KCl, NaCl 0.5 M و pH 7.0 آماده شد. هر کدام از نمونه‌ها با غلظت µg/ml 200 تهیه شد. برای ثبت طیف، هر کدام از نمونه‌ها داخل کووت کوارتز µl 300 با طول مسیر عبور نور 0/1 cm قرار داده شد. طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی نمونه‌ها در محدوده 320-180 نانومتر انجام شد. اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی توسط دستگاه اسپکتروپلاریمتر مدل J715 شرکت جاسکو انجام شد.

3- نتایج

3-1- نتایج طیف‌سنجی با دورنگ نمایی دورانی

شکل 4 طیف دورنگ نمایی دورانی دئوکسی ریبوزیم، سوبسترا و کمپلکس آنزیم سوبسترا را نشان می‌دهد. برای دئوکسی ریبوزیم پیک مثبت در اطراف 280 نانومتر با شدت نزدیک به 7 و پیک منفی در اطراف 245 نانومتر مشاهده می‌شود. این علایم از مشخصه‌های B-DNA می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی ساختار دوم دئوکسی ریبوزیم است [16،17]. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بعد از هیبریداسیون و تشکیل کمپلکس آنزیم-سوبسترا یک جابجایی در پیک مثبت مربوط به طول موج اطراف 280 نانومتر به طول موج‌های پایین‌تر یعنی به اطراف 275 نانومتر و همچنین افزایشی در شدت پیک منفی 245 نانومتر مشاهده می‌شود.

[1] Circular Dichroism



شکل 4 نمودار طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی که در محدوده طول موجی 310-200 نانومتر اندازه‌گیری شده است. تغییرات در طیف دئوکسی ریبوزیم پس از هیبرید شدن با سوبسترا که در طول موج اطراف 280، 245 و 200 نانومتر مشاهده می‌شود، نشان دهنده تغییرات ساختاری در کمپلکس دئوکسی ریبوزیم-سوبسترا می‌باشد که برای عملکرد آنزیمی ضروری است.

علاوه بر این یک پیک شدید منفی در اطراف 200 نانومتر هم ملاحظه می‌شود. همه این تغییرات نشان دهنده یک تغییر ساختاری در دئوکسی ریبوزیم بعد از هیبریداسیون می‌باشد. با توجه به این که عملکرد آنزیم منوط به ساختار دئوکسی ریبوزیم و نحوه هیبرید شدن با سوبسترا می‌باشد، تغییر ساختاری که بعد از هیبریداسیون اتفاق می‌افتد، به احتمال قوی نقشی اساسی در عملکرد اختصاصی آنزیم دارد. طبق گزارش‌های قبلی، تغییرات مشاهده شده در طیف دورنگ نمایی دورانی آنزیم را می‌توان شاهدی برای تشکیل شدن DNA سه رشته‌ای در کمپلکس آنزیم سوبسترا در نظر گرفت که در بخش بحث و نتیجه‌گیری بیشتر به آن پرداخته خواهد شد [18].

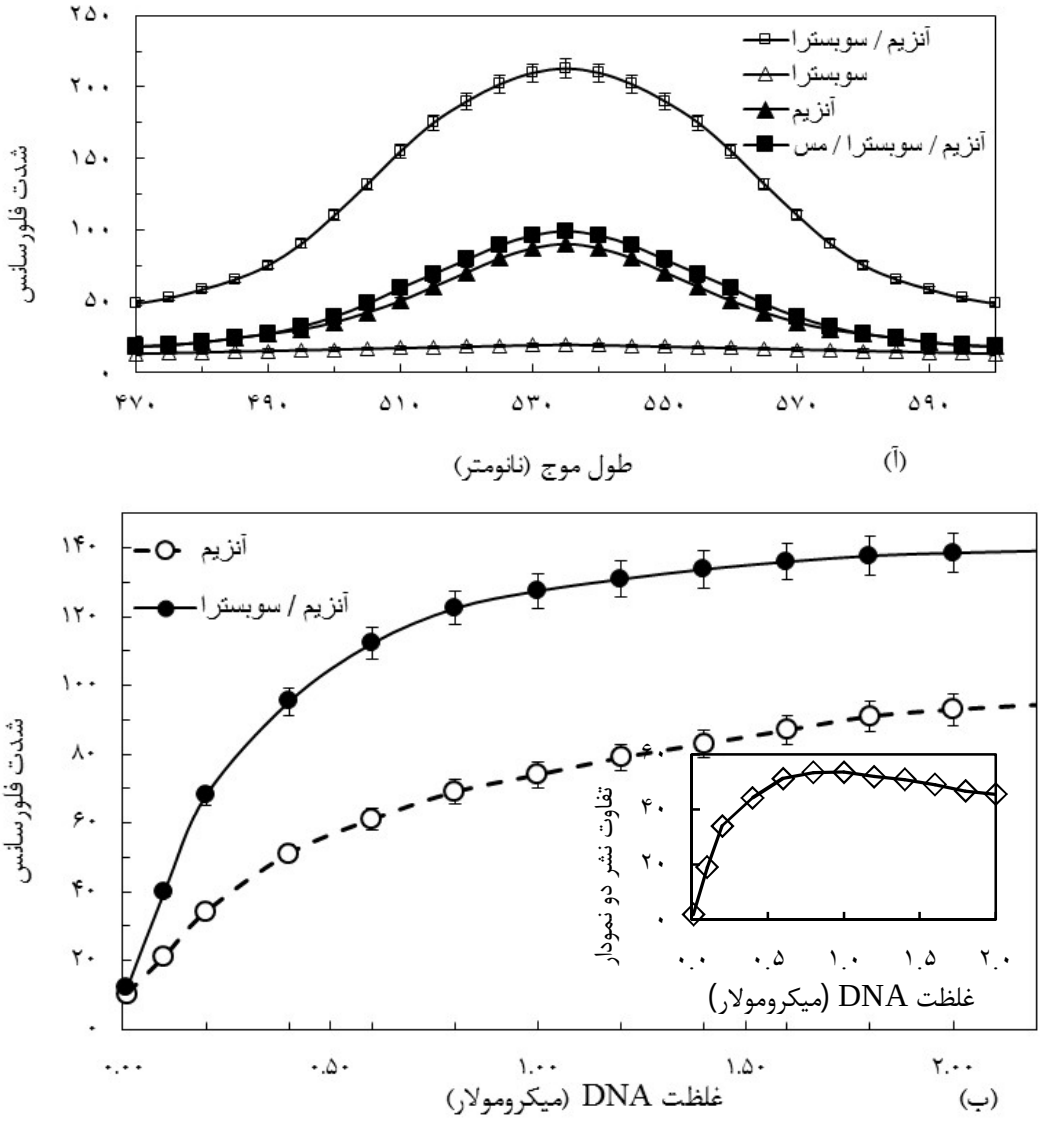
2-3- اتصال سایبر گولد به دئوکسی ریبوزیم آزاد و کمپلکس دئوکسی ریبوزیم-سوبسترا

طیف نشر فلورسانس سایبر گولد در حضور دئوکسی ریبوزیم و کمپلکس آن با سوبسترا اندازه‌گیری شد. بر اساس شرایط آزمایشگاهی انتخاب شده، شدت فلورسانس بعد از افزودن سوبسترا به دئوکسی ریبوزیم افزایش نشان می‌دهد (شکل 5- آ). نتایج همچنین نشان می‌دهد که کاهش اساسی در شدت فلورسانس زمانی رخ می‌دهد که کوفاکتور مس به محلول واکنش اضافه می‌شود و محصولات واکنش طی واکنش آنزیمی از بازوهای اتصالی دئوکسی ریبوزیم جدا می‌شوند.

نشر فلورسانس دئوکسی ریبوزیم و کمپلکس آن با سوبسترا در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد (شکل 5- ب).

تفاوت بین دو منحنی تأیید می‌کند که کار کردن در غلظت 9/. میکرومولار به بالای اسید نوکلئیک بیشترین تفاوت نشر فلورسانس، بین دئوکسی ریبوزیم آزاد و کمپلکس آن با سوبسترا را تأمین می‌کند. با توجه به هدف آزمایش که مقایسه با نتایج حاصل از روش‌های مرسوم است غلظت 1 میکرومولار برای بقیه مراحل انتخاب شد.

همچنین از اطلاعات شکل (5- ب) می‌توان برای تخمین $K_{0.5}$ (غلظتی از DNA که 50 درصد حداکثر فلورسانس در آن مشاهده می‌شود) استفاده نمود، که می‌توان آن را به عنوان ثابت تفکیک کمپلکس سایبر گولد-DNA نیز در نظر گرفت.

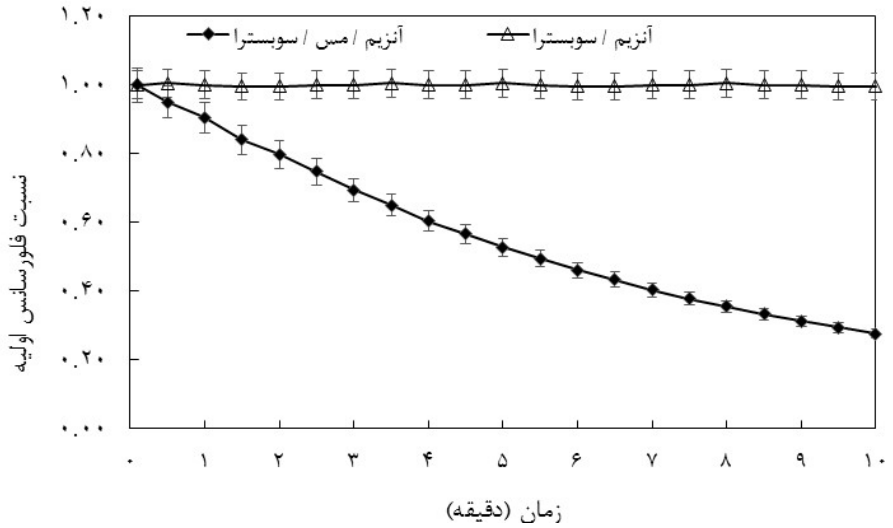


شکل 5 (آ) نشر فلورسانس سایبر گولد 1X در حضور 1 μM سوبسترا، 1 μM دئوکسی ریبوزیم و 1 μM کمپلکس آنزیم-سوبسترا. طیف‌سنجی در بافر HEPES و pH 7.0 در دمای 25℃ انجام شد. طول موج برانگیختگی برای سایبرگولد 495 نانومتر می‌باشد. (ب) نشر فلورسانس سایبر گولد 1X به عنوان تابعی از غلظت دئوکسی ریبوزیم یا کمپلکس آنزیم-سوبسترا [طول موج نشری برابر 537 نانومتر می‌باشد]. منحنی عبور داده شده از نقاط نمودار به صورت تابع هایپربولیک می‌باشد، که $k_{0.5}$ را برای دئوکسی ریبوزیم و کمپلکس آنزیم-سوبسترا به ترتیب 0.9 μM و 0.3μM به دست می‌دهد. نمودار تکمیلی، تفاوت بین فلورسانس دو نمونه در غلظت های مختلف DNA.

مقدار $K_{0.5}$ اندازه‌گیری شده برای دئوکسی ریبوزیم آزاد برابر 9/. میکرومولار و برای کمپلکس آنزیم سوبسترا، 3/. میکرومولار می‌باشد. تفاوت 3 برابری بین $K_{0.5}$، با تعداد سایبر گولدهای متصل شده به کمپلکس آنزیم-سوبسترا در مقایسه با آنزیم آزاد مطابقت دارد. با توجه به ساختار دوم پیشگویی شده دئوکسی ریبوزیم که دارای یک بازوی دور شته‌ای می‌باشد امکان اتصال سایبر گولد به این بازوی دو رشته‌ای وجود دارد.

3-3- مطالعه کینتیکی برش سوبسترا توسط دئوکسی ریبوزیم محدودکننده با استفاده از سایبر گولد

شکل 6 کم شدن شدت نشر فلورسانس بعد از افزودن 10 میکرومولار کوفاکتور مس به کمپلکس آنزیم سوبسترا را در حضور سایبرگولد نشان می‌دهد.



شکل 6 نمودار واکنش آنزیمی دئوکسی ریبوزیم محدودکننده با استفاده از سایبر گولد. تغییر در نشر سایبرگولد 1X بعد از تشکیل کمپلکس آنزیم-سوبسترا (1μM) در حضور و عدم حضور کوفاکتور مس. سایر شرایط مشترک محلول: 50 mM HEPES Buffer pH 7.0 و دمای 25℃، طول موج برانگیختگی 495 nm و طول موج نشر 537 nm.

کاهش مشاهده شده به دلیل رها شدن محصولات واکنش از سطح آنزیم می‌باشد، با در نظر گرفتن نمونه شاهد که فلورسانس کمپلکس آنزیم-سوبسترا را در عدم حضور کوفاکتور، در طول زمان مقدار ثابتی نشان می‌دهد.

نمودار به دست آمده از کاهش فلورسانس طی زمان که نشان دهنده‌ی رها شدن محصول از آنزیم است و به صورت یک نمودار با تابع نمایی است، K_{obs} برای واکنش آنزیمی را برابر $136\ min^{-1}$/. به دست می‌دهد. اصولاً برای چنین واکنشی انتظار یک نمودار نمایی برای محصول نمی‌رود، دلیل این امر شاید نبود رابطه یک به یک و کاملاً خطی بین تعداد سایبرگولدهای متصل شده و طول ساختارهای دو رشته‌ای DNA است [19].

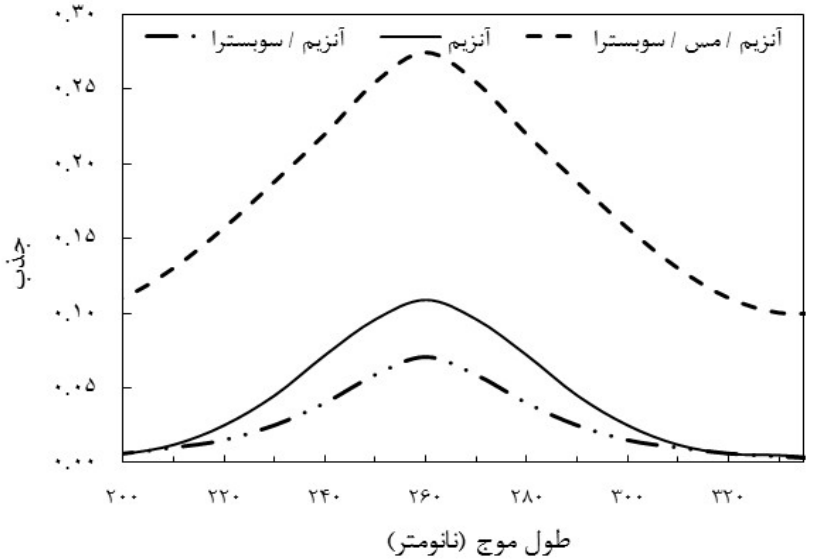
3-4- مطالعه کینتیکی بر اساس روش سنجش پررنگ شدگی پیوسته (CHA)

شکل 7 طیف جذبی دئوکسی ریبوزیم آزاد و کمپلکس آنزیم-سوبسترا را قبل و بعد از اضافه نمودن کوفاکتور در طول موج 260 نانومتر نشان می‌دهد.

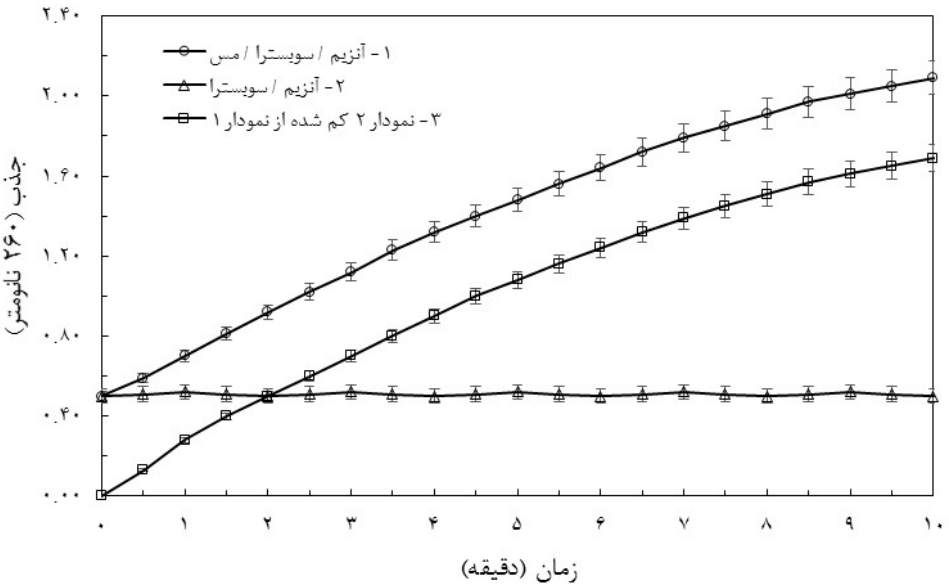
بعد از افزودن سوبسترا به روی آنزیم، کمپلکس آنزیم-سوبسترا که دارای ساختارهای دو رشته‌ای است تشکیل می‌شود. به دنبال این پدیده میزان جذب محلول در طول موج 260 نانومتر کاهش می‌یابد که به علت کم رنگی[1] DNA می‌باشد. بعد از افزودن کوفاکتور به کمپلکس آنزیم-سوبسترا و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم و رها شدن محصولات واکنش که قطعات کوتاه DNA می‌باشند، میزان جذب طول موج 260 نانومتر افزایش می‌یابد که به دلیل پررنگی[2] DNA است. با استفاده از روش CHA می‌توان به صورت ممتد چگونگی فعالیت دئوکسی ریبوزیم محدودکننده را ثبت کرد، میزان افزایش جذب در طی زمان منعکس کننده میزان رها شدن محصول از سطح آنزیم است. از این اندازه‌گیری می‌توان برای تخمین پارامترهای کینتیکی دئوکسی ریبوزیم استفاده نمود.

شکل 8 افزایش جذب طول موج 260 نانومتر نمونه کمپلکس آنزیم-سوبسترا را پس از افزودن کوفاکتور مس به آن نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، میزان جذب طول موج 260 نانومتر با گذشت زمان افزایش می‌یابد.

[1] Hypochromicity
[2] Hyperchromicity



شکل 7 نمودار طیف جذبی فرابنفش دئوکسی ریبوزیم و کمپلکس آنزیم-سوبسترا قبل و بعد از افزودن کوفاکتور مس. به دنبال افزوده شدن کوفاکتور مس و شروع شدن واکنش آنزیمی، محصولات واکنش که قطعات کوتاه DNA تک رشته‌ای می‌باشند رها می‌شوند، که منجر به افزایش چشمگیر جذب در طول موج 260 نانومتر شده است که این امر به به دلیل پررنگی DNA می‌باشد.



شکل 8 افزایش جذب فرابنفش در 260 نانومتر نمونه کمپلکس دئوکسی ریبوزیم-سوبسترا بعد از افزودن کوفاکتور مس به محلول واکنش که در فواصل زمانی منظم ثبت شده است.

افزایش مشاهده شده به دلیل رها شدن محصول از سطح آنزیم است که نمادی از سرعت واکنش آنزیمی می‌باشد. نمودار واکنش به صورت یک تابع هایپربولیک است. K_{obs} حاصل از نمودار برابر $144\ min^{-1}$/. به دست آمد.

4- بحث

در این مطالعه دئوکسی ریبوزیم محدودکننده وابسته به کوفاکتور مس، به وسیله تکنیک‌های طیف‌سنجی به منظور بررسی ساختار و فعالیت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج

حاصل از طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی شاهد مستقیمی را برای تشکیل ساختار DNA سه رشته‌ای (که برای عملکرد این آنزیم ضروری است) ارائه نمود. نتایج حاصل از طیف‌سنجی‌های فرابنفش و فلورسانس خارجی نیز رویکرد جدیدی را برای مطالعه کینتیکی دئوکسی ریبوزیم ها ارائه نموده است.

مطالعات دورنگ نمایی دورانی مربوط به دئوکسی ریبوزیم می‌تواند اطلاعاتی در مورد ساختار دوم آن نشان دهد [20]، همان‌طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، دئوکسی ریبوزیم مشخصات ساختاری شبیه B-DNA را نشان می‌دهد، که دارای یک پیک مثبت در اطراف طول موج 278 و یک پیک منفی در اطراف 240 نانومتر می‌باشد. با توجه به اینکه دئوکسی ریبوزیم در ساختار خود دارای بخش دور شته‌ای می‌باشد، این طیف نشان-دهنده‌ی ساختار B-DNA این بخش می‌باشد. کمپلکس آنزیم-سوبسترا دارای یک زنجیره سه رشته‌ای و یک زنجیره دور شته‌ای می‌باشد. زنجیره سه رشته‌ای با اندرکنش سوبسترا و بخش دور شته‌ای دئوکسی ریبوزیم از طریق پیوندهای هیدروژنی هاگستینی، در محل شیار اصلی DNA دور شته‌ای، تشکیل می‌شود [3]. طیف دئوکسی ریبوزیم پس از هیبرید شدن با سوبسترای DNA خود یک تغییر اساسی نشان می‌دهد که یک جابجایی در پیک مثبت از 280 به 275 نانومتر، افزایش شدت پیک منفی 245 نانومتر و یک پیک منفی شدید در 205 نانومتر می‌باشد. طبق گزارش‌های موجود DNA سه رشته‌ای دارای طیف استاندارد، مثل آنچه در مورد فرم‌های مختلف DNA مشاهده شده، نیست [21]. ولی بر اساس مطالعات مشابه که بر روی تشکیل ساختارهای DNA سه رشته‌ای (مشابه با آنچه در کمپلکس آنزیم سوبسترا وجود دارد) گزارش شده است، جابجایی در پیک مثبت 280 نانومتر به سمت طول موج‌های پایین و افزایش شدت پیک منفی در 245 نانومتر به عنوان شاهدی بر تشکیل DNA سه رشته‌ای می‌باشد [۱۸،۲۲] که در نتایج به دست آمده از طیف دورنگ نمایی در دو حالت دئوکسی ریبوزیم و کمپلکس آنزیم-سوبسترا مشاهده می‌شود. با توجه به نقش کوفاکتور به عنوان عامل فعال اکسنده-کاهنده در مکانیسم کاتالیتیکی آنزیم، به احتمال قوی برش اختصاصی آنزیم در جایگاه تعریف شده سوبسترا به علت تغییر ساختاری است که بعد از هیبریداسیون و تشکیل کمپلکس در آنزیم رخ می‌دهد، که این امر نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد [2].

روش‌های معمول مورد استفاده برای تعیین پارامترهای کینتیکی دئوکسی ریبوزیم محدودکننده و سایر دئوکسی ریبوزیم ها که دارای سوبسترای اسید نوکلئیکی هستند با استفاده از سوبسترای نشاندار رادیواکتیو انجام می‌شود، که تشکیل محصول در بازه‌های زمانی مختلف را اندازه‌گیری می‌کند. افتراق محصولات واکنش بر پایه‌ی روش‌های جدا سازی فیزیکی انجام می‌شود که با استفاده از تکنیک‌های تجزیه‌ای مثل الکتروفورز صورت می‌گیرد [۲۲،۲۳]. روش‌های پیوسته برای مطالعه این نوع دئوکسی ریبوزیم ها به ندرت استفاده می‌شود و اغلب نیازمند مراحل نشانگذاری سوبسترا و یا استفاده از چند سیستم شناسایی هم‌زمان است. در برابر این چالش، در این مطالعه روش-هایی بر اساس طیف‌سنجی پیشنهاد شده که امکان اندازه-گیری پیوسته، مستقیم و در داخل محلول را برای این نوع از آنزیم‌ها ممکن می‌کند.

مطالعات قبلی انجام شده روی دئوکسی ریبوزیم محدود کننده وابسته به مس گزارشاتی از پارامترهای کینتیکی این آنزیم را در اختیار قرار داده است. برای مقایسه داده‌های بدست آمده از آزمایش با داده‌های مقالات منتشر شده، غلظت‌ها و شرایط آزمایش مطابق با شرایط مقالات می‌باشد. K_{obs} گزارش شده برای دئوکسی ریبوزیم دومولکولی مورد بحث توسط R. R. Breaker برابر 0.15 min^{-1} می‌باشد، که محلول واکنش در 23درجه سانتیگراد

و غلظت دئوکسی ریبوزیم و سوبسترا 1 میکرومولار است [15،3،1]. نتایج آزمایش‌های این تحقیق نشان‌دهنده آن است که K_{obs} برای روش فلورسانس سایبر گولد 0.136 min^{-1} و برای روش CHA برابر $0.144\ min^{-1}$ می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج بدست آمده از روش-های ارائه شده بسیار نزدیک به مقدار گزارش شده در مقالات مرجع می‌باشد که صحت استفاده از روش‌های مورد نظر را نشان می‌دهد. تفاوت بین مقادیر K_{obs} با استفاده از روش فلورسانس ارائه شده در این تحقیق و مقدار گزارش شده در مقاله‌ی مرجع بیشتر از تفاوت آن با مقدار ارائه شده در روش CHA است. علت این تفاوت بیشتر به دلیل استفاده از نشانگر خارجی در محلول واکنش است که در فرایند جدا شدن محصول از آنزیم و یا در روند خود واکنش آنزیمی تداخل اندکی ایجاد می-کند که با توجه به نتایج قابل چشم پوشی است. همچنین توجه به این نکته مهم است که اگر مرحله رها شدن محصول مرحله محدودکننده سرعت واکنش آنزیمی باشد، مقدار K_{obs} اندازه‌گیری شده به وسیله سایبرگولد باید اساساً از مقدار مشابه اندازه‌گیری شده توسط سوبسترای رادیواکتیو کمتر باشد (با استفاده از سوبسترای رادیواکتیو اندازه‌گیری سرعت بدون توجه به رها شدن یا نشدن محصول انجام می‌شود) [19]. به هر حال در دئوکسی ریبوزیم محدودکننده فرایند برش سوبسترا توسط آنزیم خیلی آهسته تر از مرحله‌ی آزاد شدن سوبسترا می‌باشد، بنابراین، سرعت مشاهده شده به وسیله‌ی سایبرگولد منعکس کننده سرعت مرحله‌ی برش شیمیایی است. این نکته با مشاهده نتایج نزدیک بین K_{obs} اندازه‌گیری شده با سایبرگولد و مقادیر اندازه‌گیری شده با سوبسترای رادیواکتیو به دست آمده از آزمایش‌های R. R. Breaker تأیید می‌شود.

روش CHA نسبت به طیف‌سنجی فلورسانس مزایایی دارد که ناشی از عدم استفاده از عامل خارجی یا رنگ در اندازه‌گیری‌ها می‌باشد، اول اینکه در این روش عامل خارجی و مزاحم در فرایند آنزیمی واکنش وجود ندارد و اندازه‌گیری‌ها در حالت طبیعی واکنش آنزیمی است. مزیت دوم این است که سرعت اتصال و جدا شدن عامل خارجی نمی‌تواند روی اندازه‌گیری‌های کینتیکی تأثیر بگذارد. مزیت سوم این روش هزینه پایین استفاده از این روش در برابر روش طیف‌سنجی فلورسانس خارجی است.

در روش‌های ارائه شده، مشاهده سیگنال‌ها بعد از برش سوبسترا تابع جدا شدن محصول از بازوهای اتصالی دئوکسی ریبوزیم است. برای دست‌یابی به این امر باید چند نکته در نظر گرفته شود. اول اینکه طول بازوهای اتصالی زیاد بلند نباشد، دوم اینکه دمای محلول واکنش در جدا شدن محصول از بازوها اهمیت دارد و سوم غلظت آنزیم و سوبسترا. باید غلظت دئوکسی ریبوزیم در محلول از ثابت تفکیک ترمودینامیک کمپلکس دئوکسی ریبوزیم-سوبسترا کمتر باشد. در اندازه‌گیری‌های فلورسانس سایبر گولد افزایش دما باعث فرونشانی فلورسانس سایبرگولد می‌شود، که استفاده از این روش را در دماهای بالا محدود می‌کند [24]. این محدودیت، در روش CHA که از اثر ذاتی اجزای واکنش برای اندازه-گیری پارامترهای کینتیکی استفاده می‌کند وجود ندارد.

روش‌های طیف‌سنجی قادر به بررسی و مطالعه مستقیم مولکول‌های زیستی هستند. روش دو رنگ نمایی دورانی تغییرات ساختاری در کمپلکس آنزیم-سوبسترا که برای واکنش آنزیمی ضروری هستند را نشان می‌دهد و همچنین شاهد مستقیمی برای تشکیل DNA سه رشته‌ای می‌باشد، که منحصر به دئوکسی ریبوزیم محدودکننده وابسته به کوفاکتور مس است. نتایج حاصل از روش‌های طیف‌سنجی که در این مطالعه از آن ها استفاده شده است، قابل مقایسه با نتایج به دست آمده از روش‌های مرسوم برای مطالعه کینتیکی دئوکسی ریبوزیم محدود کننده

است. لذا در این مطالعه روش‌های جدیدی برای مطالعه کینتیکی دئوکسی ریبوزیم محدود کننده و حتی سایر دئوکسی ریبوزیم‌ها با سوبسترای اسید نوکلئیکی ارائه شده است که سریع، ارزان و قابل دسترس‌تر می‌باشند. به هر حال برای نتیجه گیری قطعی و مشخص شدن نقاط ضعف و قوت در مورد روش‌های ارائه شده، نیازمند است که مطالعات تکمیلی و مقایسه‌ای بیشتری انجام شود.

5- منابع

[1] Carmi N, Breaker RR (2001) Characterization of a DNA-Cleaving Deoxyribozyme. Bioorganic & Medicinal Chemistry 9: 2589-2600.

[2] Bashkin JK (1997) DNA enzymes: New-found chemical reactivity. Biochemistry 7: 286-288.

[3] Reaker RORB (1998) Cleaving DNA with DNA. Biochemistry 95: 2233-2237.

[4] McManus SA, Li Y (2010) The structural diversity of deoxyribozymes. Molecules 15: 6269-6284.

[5] Liu M, Zhao H, Chen S, Yu H, Zhang Y, et al. (2011) A "turn-on" fluorescent copper biosensor based on DNA cleavage-dependent graphene-quenched DNAzyme. Biosens Bioelectron 26: 4111-4116.

[6] Liu J, Cao Z, Lu Y (2009) Functional nucleic acid sensors. Chem Rev 109: 1948-1998.

[7] Gao L, Li L-L, Wang X, Wu P, Cao Y, Liang B, et al. Graphene-DNAzyme Junctions: A Platform for Direct Metal Ion Detection with Ultrahigh Sensitivity. Chem Sci. 2015 Apr; 6(4): 2469–73.

[8] Hu W, Min X, Li X, Yang S, Yi L, Chai L. DNAzyme catalytic beacons-based a label-free biosensor for copper using electrochemical impedance spectroscopy. RSC Adv [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2016;6(8):6679–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C5RA20641C.

[9] Huang P-JJ, Liu J. An Ultrasensitive Light-up Cu2+ Biosensor Using a New DNAzyme Cleaving a Phosphorothioate-Modified Substrate. Anal Chem [Internet]. American Chemical Society; 2016 Feb 9; Available from: http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04904.

[10] Chang Y, Chai Y, Xie S, Yuan Y, Zhang J, Yuan R. Cleavage-based hybridization chain reaction for electrochemical detection of thrombin. Analyst [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2014;139(17):4264–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C4AN00712C.

[11] Singh KK, Parwaresch R, Krupp G (1999) Rapid kinetic characterization of hammerhead ribozymes by real-time monitoring of fluorescence resonance energy transfer (FRET). RNA 5: 1348-1356.

[12] Liu J, Lu Y (2007) A DNAzyme Catalytic Beacon Sensor for Paramagnetic Cu 2 + Ions in Aqueous Solution with High Sensitivity and Selectivity. Acs Symposium Series 9839-9838: 129.

[13] Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung C-y, et al. (1999) Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized for Use with 300-nm Ultraviolet Transilluminators. Analytical Biochemistry 268: 278 -288.

[14] Minetti CA, Remeta DP, Breslauer KJ (2008) A continuous hyperchromicity assay to characterize the kinetics and thermodynamics of DNA lesion recognition and base excision. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 70-75.

[15] Carmi N, Shultz LA, Breaker RR (1996) in vitro selection of self-cleaving DNAs. Chemistry & Biology. pp. 1039-1046.

[16] Sun Xueguang CE, Bai Chunli, He Yujian (1998) Circular dichroism spectra of different structures formed by the oligonucleotids. Chinese Science Bulletin 43: 1456-1460.

[17] Ranjbar B, Gill P, Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. In: editor. Chem Biol Drug Des: Chem Biol Drug Des. pp. 101–120.

[18] Gondeau C, Maurizot JC, Durand M (1998) Circular dichroism and UV melting studies on formation of an intramolecular triplex containing parallel T * A: T and G * G: C triplets: netropsin complexation with the triplex. Nucleic Acids Research 26: 4996-5003.

[19] Ferrari D, Peracchi A (2002) A continuous kinetic assay for RNA-cleaving deoxyribozymes, exploiting ethidium bromide as an extrinsic¯ uorescent probe. Luminescence 30: e112.

[20] Kypr J, Kejnovska I, Renciuk D, Vorlickova M

(2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. Nucleic Acids Res 37: 1713-1725.

[21] Bhaumik SR, Chary KVR, Govil G, Liu K, Miles HT (1998) A novel palindromic triple-stranded structure formed by homopyrimidine dodecamer d-CTTCTCCTCTTC and homopurine hexamer d-GAAGAG. pp. 298 2988-1 [22] Khomyakova EB, Gousset H, Liquier J, Gouyette C, Takahashi M, et al. (2000) Parallel intramolecular DNA triple helix with G and T bases in the third strand stabilized by Zn 2 + ions. Nucleic Acids Research 28: 3511-3516.

[22] Cairns MJ, King A, Sun L-q (2003) Optimisation of the 10 ± 23 DNAzyme ± substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine ± cytosine target sites. Nucleic Acids Research, 31.

[23] Matsumoto N, Toga T, Hayashi R, Sugasawa K, Katayanagi K, et al. (2010) Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. Nucleic Acids Res 38: e101.