

مطالعه اهمیت و نقش اسیدهای آمینه آسپاراژین ۲۸ و لیزین ۳۰ فوتوپروتئین اکورین در جذب کلسیم

معصومه اسماعیل نژاد^۱، مهدی زین‌الدینی^{۱*} و نادر مقصودی^۲

^۱ تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی

^۲ تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز علوم اعصاب

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۹

چکیده

فوتوپروتئین اکورین جدا شده از عروس دریایی *اکوریا ویکتوریا*، فوتوپروتئین حساس به کلسیم است که از اپواکورین و گروه پروستاگندین کوالترازین تشکیل شده و در اثر اتصال به کلسیم سبب نشر نور آبی می‌شود. این پروتئین مونومری شامل چهار موتیف EF hand است که سه موتیف آن می‌تواند به کلسیم متصل شود. از سوی دیگر افزایش کلسیم در مغز می‌تواند منجر به بیماریهای عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون و سکتة مغزی گردد. اکورین با توجه به اینکه در گروه پروتئینهای متصل شونده به کلسیم (CBPs) قرار دارد، همانند یک اسفنج می‌تواند کلسیم مازاد را در نرونهای عصبی جذب نماید. هدف تحقیق حاضر ایجاد جهشهای هدفمند در اکورین به منظور افزایش حساسیت آن به کلسیم است. در این تحقیق، با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند، دو جهش نقطه‌ای در اسیدهای آمینه آسپاراژین ۲۸ و لیزین ۳۰ ($N^{28}D$ و $K^{30}T$) در ناحیه EF hand I طراحی گردید و درون سیستم بیانی pET21 کلون و بیان شد. با توجه به طراحی دنباله هیستیدین، تخلیص پروتئینهای جهش یافته به کمک ستونهای نیکله انجام شد و در نهایت حساسیت جهشهای مذکور به کلسیم با نمونه اولیه، مقایسه گردید. نتایج حساسیت پروتئینهای تولیدی به کلسیم، نشان داد که جهش $K^{30}T$ در مقایسه با نمونه اولیه، حساسیت و میل ترکیبی بالاتری به کلسیم از خود نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: فوتوپروتئین اکورین، جهش، کلسیم، حساسیت.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۹۷۴۶۰۰، پست الکترونیکی: zeinodini52@mut.ac.ir

مقدمه

به نام کوالترازین (از خانواده لوسیفرین). در حقیقت کمپلکس اکورین مشابه آنزیم است که وقتی ۳ یون کلسیم به این کمپلکس باند می‌شود، کوالترازین به کوالترامید، اکسیده می‌شود و سبب آزاد شدن اپواکورین، CO_2 و نوری با طول موج ۴۶۹ نانومتر (آبی رنگ) می‌شود. از نظر ساختاری اکورین پروتئینی با ۱۸۹ اسید آمینه است که دارای سه جایگاه اتصال به کلسیم در هنگام فعالیت است. به دلیل حساسیت بالای اکورین به غلظت کلسیم، سازگاری زیستی آن با سلولهای زنده و دارا بودن درصد

در سال ۱۹۶۱ یک دانشمند ژاپنی مقیم آمریکا به نام اوسامو شیمومورا برای اولین بار یک پروتئین غیرمعمول بیولومینسانس را از نوعی ستاره دریایی به نام *اکوریا ویکتوریا* شناسایی کرد که براساس نام ژنریک عروس دریایی مذکور آن را اکورین نامید (۱۸). این پروتئین قدرت انتشار نور را در محلولهای آبی در اثر افزودن مقدار کمی کلسیم (Ca^{2+}) داراست. کمپلکس اکورین شامل سه بخش مجزا است، یک آپوپروتئین حدود ۲۳ کیلودالتونی به نام اپواکورین، مولکول اکسیژن و یک گروه پروستتیک

پریواژن استفاده شده است (۱ و ۱۷). در تحقیق حاضر با ایده برداری از برخی CaBPs نظیر کالمودولین، دو جهش در موتیف EF Hand I ($N^{28}D$ و $K^{30}T$) اعمال شد تا حساسیت پروتئین به کلسیم در مقایسه با نمونه اولیه مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

ایجاد جهشهای هدفمند: جهشهای هدفمند، براساس روش Quick change site directed mutagenesis، انجام شد. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی به طور مکمل مخالف رشته‌های پلاسمید طراحی شده و در طی سیکل‌های دمایی گسترش می‌یابد (جدول ۱). براساس روش مذکور، تکثیر پلاسمیدی با استفاده از آنزیم پلیمرز PWO صورت گرفته و پس از هضم رشته‌های اولیه با آنزیم محدودگر *DpnI* (10 U/ μ l)، درون باکتریهای مستعد شده XL-1 Blue انتقال یافت. در ادامه استخراج پلاسمید از کلونهای حاصله به دست آمده و با استفاده از دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *EcoRI*، صحت کلونها تأیید و جهت بررسی جهشهای مربوطه به شرکت ژن‌فناوران ارسال گردید. لازم به توضیح است که پلاسمید pET-aequorin (کلون ژن رمز کننده اکورین درون جایگاههای برش *NdeI* و *EcoRI* پلاسمید pET21) از مطالعه قبلی به دست آمد (۲۳).

بسیار بالای سیگنال نسبت به نویز پس زمینه، از این فتوپروتئین به عنوان مارکر جهت شناسایی مقادیر پایین محصولات معدنی (کمتر از ۰/۰۱ مولکول) و به خصوص کلسیم استفاده می‌شود (۳، ۹ و ۱۰). با توجه به اینکه تهیه اکورین طبیعی از عروس دریایی زمان بر بوده و بازده کمی نیز دارد در سال ۱۹۸۵ به طور همزمان دو گروه آزمایشگاهی به رهبری پراشر و اینوی، cDNA آپو اکورین را با استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک، کلون کردند (۱۱ و ۱۶). همچنین بر مبنای کاربردهای زیاد اکورین، تا به امروز جهشهای مختلفی بر روی این پروتئین انجام شده است که سبب افزایش کارایی و ایجاد خصوصیات بیشتر برای آن شده است (۶، ۷، ۱۳ و ۱۵). از سوی دیگر مطالعات محققین نقش و ارتباط پروتئینهای اتصالی به کلسیم (CaBPs) نظیر کالباندین و اکورین را در حفاظت از سلولهای عصبی نشان می‌دهد. اغلب این مطالعات بیانگر این نکته مهم بوده است که در مغز حیوانات مسن نظیر انسان، کاهش چشمگیر CaBPs مشاهده می‌شود (۲، ۴ و ۲۲). با در نظر گرفتن اینکه اکورین در گروه پروتئینهای متصل شونده به کلسیم قرار دارد، از این پروتئین مشابه اسفنج به منظور مهار کلسیم اضافی تولید شده در بیماریهای آسیب رسان به نرونهای عصبی، استفاده می‌شود. به طوری که از اکورین به عنوان ماده محافظ سلولهای عصبی در قالب دارو و مکمل غذایی به نام

جدول ۱ - توالی و اندازه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق.

| نام پرایمر | توالی | اندازه (bp) |
|------------|--|-------------|
| F-N-28-D | 5' - CTG GAT GTG AAC CAC GAT GGT AAA ATC TCT CTG - 3' | ۳۳ |
| R-N-28-D | 5' - CAG AGA GAT TTT ACC ATC GTG GTT CAC ATC CAG - 3' | ۳۳ |
| F-K-30-T | 5' - GTG AAC CAC AAC GGT ACC ATC TCT CTG GAC GAA ATG - 3' | ۳۶ |
| R-K-30-T | 5' - CAT TTC GTC CAG AGA GAT GGT ACC GTT GTG GTT CAC - 3' | ۳۶ |

حاصله، القای بیان با یک میلی مولار IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. با توجه به طراحی دنباله هیستدین در انتهای آمینو پروتئین، پس از القاء با استفاده از ستون Ni-NTA، دو نوع پروتئین جهش یافته $aeq-N^{28}D$

بیان و خالص سازی فتوپروتئین اکورین جهش یافته: پس از تأیید مولکولی حضور توالی جهش یافته مورد نظر در اکورین اولیه، وکتور نوترکیب به سلولهای BL21(DE3) مستعد شده، ترانسفورم گردید. بعد از کشت تک کلنی

ساخت سازه ژنی فوتوپروتئین اکورین جهش یافته: پس از انجام جهش‌های هدفمند، محصول PCR بر روی ژل آگاروز آنالیز شد که تکثیر پلاسمید با اندازه حدود ۶ kb بیانگر صحت تکثیر است (شکل ۱-الف). همچنین پس از هضم آنزیمی *DpnI* و انتقال پلاسمید به درون باکتری *E. coli*، از کلونهای به دست آمده مجدد 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 (pET-aequorin) است (شکل ۱-ب). پلاسمیدهای تأیید شده جهت تعیین ترادف، به شرکت مربوطه ارسال گردید که نتایج تعیین ترادف نیز بیانگر صحت جهش‌های اعمال شده بود (شکل ۲).

تولید پروتئینهای جهش یافته: در ادامه پلاسمیدهای pET-aequorin بدون جهش و جهش یافته، درون باکتری بیانی، انتقال یافته و پس از القاء با استفاده از ستونهای Ni-NTA خالص شدند. مطابق شکل ۳، خلوص مطلوب از پروتئینهای جهش یافته به دست آمده است.

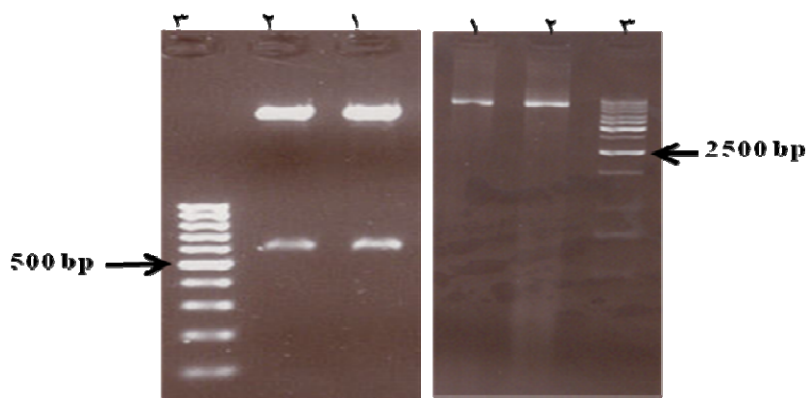
خصوصیات پروتئینهای جهش یافته: فعالیت اکورین اولیه و جهش یافته براساس روش سنجش ارائه شده در بخش مواد و روشها و با استفاده از دستگاه لومینومتر صورت گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که $\text{aeq-K}^{30\text{T}}$ فعالیت بالاتر و $\text{aeq-N}^{28\text{D}}$ عملکرد پایین تری نسبت به اکورین بدون جهش (aeq.) از خود نشان می دهد (شکل ۴).

تیتراسیون کلسیم پروتئین نوترکیب اولیه و جهش یافته: جهت تعیین میزان حساسیت به کلسیم نمودار منفی لگاریتم غلظت کلسیم در برابر لگاریتم شدت نور ترسیم گردید و نسبت به نمونه اکورین فاقد جهش مقایسه شد. نتایج حاصله نشان داد که جهش $\text{K}^{30\text{T}}$ به مقادیر کمتر کلسیم واکنش می دهد. به عبارت دیگر این جهش دارای حساسیت بالاتری به کلسیم در مقایسه با جهش $\text{N}^{28\text{D}}$ و اکورین اولیه است (شکل ۵).

و $\text{aq-K}^{30\text{T}}$ 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 mg/ml به همراه ۳۰ mM سوربیتول، در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد، ذخیره سازی شدند.

ارزیابی عملکرد فوتوپروتئین اکورین جهش یافته: ۵ میکروگرم از نمونه پروتئین بدون جهش یا جهش یافته به ۱۵ میکرولیتر از بافر ۱ (5 mM Tris, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, pH 8) اضافه شد. سپس ۵ میکرومولار از کوالترازین به آن افزوده شده و به مدت حداقل یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، انکوبه گردید. در نهایت نیز پس از ۱۰ الی ۲۰ بار رقیق سازی مخلوط مذکور با بافر ۲ (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8)، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از بافر ۳ (50 mM Tris, 15 mM CaCl₂, 5 mM EDTA, pH 8) بلافاصله نشر نوری (relative luminescence, RLU) به کمک دستگاه لومینومتر (Berthold Detection Systems, GmbH)، خوانش شد. جهت انجام تیتراسیون کلسیم، کلرید کلسیم با استفاده از EDTA جهت حذف یونهای زائد خالص سازی و در طی چند مرحله با استفاده از کوره در دمای بالا (۳۵۰ درجه سانتی گراد)، آب گیری شد. در ادامه دو میکرولیتر از مخلوط ۵۰ میکرولیتری اشاره شده در بالا به ۱۰۰ میکرولیتر محلولهای رقیق شده از غلظتهای 10^{-9} تا 10^{-2} کلرید کلسیم انتقال داده شد و شدت نور حاصل از مقادیر مختلف غلظت کلسیم به وسیله دستگاه لومینومتر خوانش گردید و میانگین مقادیر متفاوت از شدت نور پروتئینها، حاصل از چند مرحله خوانش اندازه گیری و سپس نمودار حاصل ترسیم و حساسیت به کلسیم در جهشهای مختلف با پروتئین اکورین فاقد جهش مقایسه گردید. لازم به توضیح است که آزمایشات با سه بار تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج



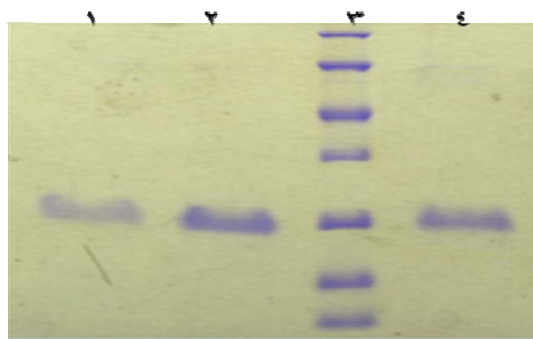
ب

الف

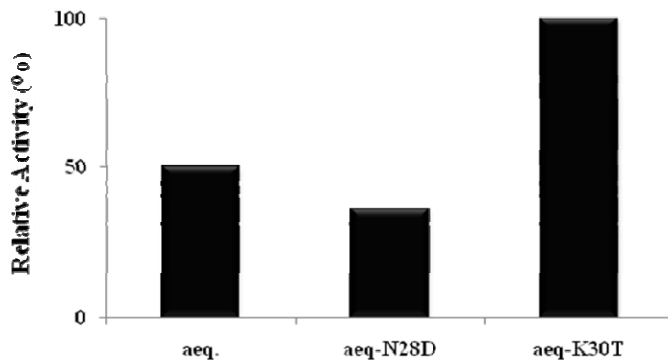
شکل ۱- الف- نتایج ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR دو جهش انجام شده بر اساس شرایط و برنامه جهش نقطه ای Quick Change (۱).
 ب- نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید های pET-aequorin جهش یافته، با دو آنزیم *EcoRI* و *NdeI*. ۱ kb مارکر (۳، $K^{30}T$ (۲، $N^{28}D$ (۱).
 ۱۰۰bp مارکر (۳، $N^{28}D$ (۲، $K^{30}T$ (۱).

aequorin) .. AACTTCCTGGATGTGAACCAC AACGGTAAAATCTCTCTGGACGAAATGGT....
 $N^{28}D$) AACTTCCTGGATGTGAACCAC GATGGTAAAATCTCTCTGGACGAAATGGT...
 $K^{30}T$) AACTTCCTGGATGTGAACCACAACGGT ACCATCTCTCTGGACGAAATGGT...

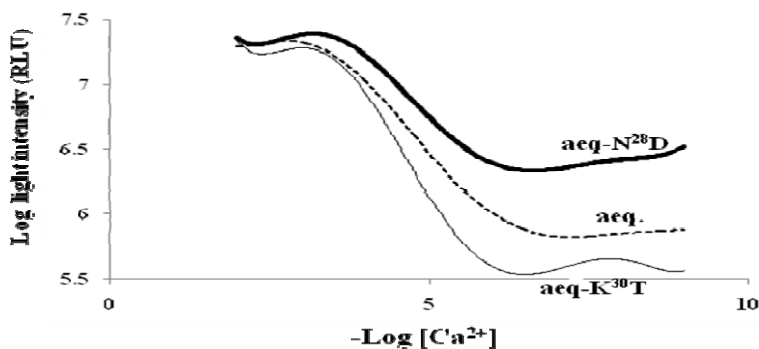
شکل ۲- نتیجه مربوط به تعیین ترادف جهشهای $K^{30}T$ و $N^{28}D$



شکل ۳- نمونه خالص پروتئین فاقد جهش و جهش یافته. (۱) اکورین جهش یافته (aeq- $N^{28}D$) (۲) اکورین بدون جهش (aeq.)، (۳) مارکر وزن مولکولی (از پایین به بالا: ۱۴/۴، ۱۸/۸، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۶۶، ۱۱۶ کیلودالتون)، (۴) اکورین جهش یافته aeq- $K^{30}T$.



شکل ۴- آنالیز عملکرد اکورین اولیه (aeq.) و جهش یافته. (آزمایشات با سه بار تکرار می باشد).

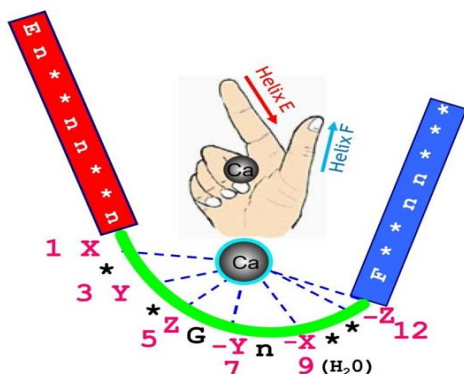


شکل ۵- نمودار مقایسه حساسیت به کلسیم در اکورینهای جهش یافته و بدون جهش (aeq.).

در میل اتصال به کلسیم می‌گردد. به طوری که اعمال جهش $D^{133}E$ در موقعیت +Z، در EF-hand کالمودولین سبب کاهش میل تمایلی آن به کلسیم شده است (۲۱). همچنین جهشهای زیادی تاکنون بر روی EF-hand های اکورین انجام شده است. جهشهای $D^{119}A$ در موقعیت +y، $D^{117}G$ در موقعیت +x و $D^{153}G$ در موقعیت +x، سبب کاهش حساسیت به کلسیم شده است. در حالی که جهشهای $N^{26}D$ سبب افزایش حساسیت به کلسیم شده است (۱۲، ۱۹ و ۲۰).

بحث

پروتئینهای متصل شونده به کلسیم (CBPs) نقش مهمی در کاهش غلظت کلسیم داخل سلولی نرونها دارند. تحقیقات نشان داده که تنظیم سطح کلسیم در ایسکمی از طریق CBPs تسهیل می‌شود. همچنین مشخص شده است که در طی کهولت، کاهش در CBPs نرونی مانند کالبایندین صورت می‌گیرد. CBPs به طور طبیعی در سراسر بدن یافت می‌شود و مسئول حفظ سلامت سلولها در برابر کهولت است. در انسان سالم یک میزان فراوان از این نوع پروتئین، وجود دارد به طوری که قدرت تنظیم کلسیم را فراهم می‌کند، ولی در افراد مسن به جایگزینی این پروتئینهای کاهش یافته نیاز است (۵). از سال ۲۰۰۴ یک شرکت تحقیقاتی اقدام به ارائه دارو و مکمل غذایی به نام پریواژن نمود که ماده اولیه آن از اکورین تشکیل شده است و سبب جلوگیری از پیشرفت آلزایمر می‌گردد (۱۷ و ۱۸). اکورین دسته ای از CBPs است که قادر به جذب کلسیم اضافی درون سلولهای عصبی است. از نظر ساختاری این پروتئین دارای چهار موتیف EF-hand است که از طریق سه موتیف می‌تواند کلسیم را جذب نماید. بر اساس مطالعات صورت گرفته، درقسمت EF-hand های CBPs، ۱۲ اسیدآمینه وجود دارد که اسیدآمینه های ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۲ می‌تواند با کلسیم واکنش دهد (شکل ۶) (۸ و ۱۴).



شکل ۶- تصویری از موتیف EF hand و موقعیتهای متصل شونده به کلسیم.

بر اساس مطالعات جهش‌زایی انجام گرفته در موقعیتهای مذکور و بر مبنای مقایسه اسیدهای آمینه موجود در EF-hand کالمودولین و اکورین، دو جهش $N^{28}D$ و $K^{30}T$ ، در ناحیه EF hand I اکورین طراحی گردید. در این حالت اسپارژین ۲۸ در موقعیت +z به اسید آمینه اسیدی اسپاراتیک و اسیدآمینه بازی لیزین ۳۰ در موقعیت -y به ترئونین تبدیل می‌شود تا با افزایش شرایط اسیدی لوپ

که می‌توان با تولید آن در راستای طراحی بهینه دارو و مکمل غذایی پریواژن جهت جلوگیری از پیشرفت بیماری آلزایمر، اقدام نمود.

مذکور، میل تمایلی آن به کلسیم بررسی گردد. نتایج حاصله نشان داد که جهش K^{30T} سبب افزایش فعالیت و همچنین افزایش حساسیت پروتئین اکورین به کلسیم در مقایسه با پروتئین جهش نیافته و جهش N^{28D} شده است

منابع

1. ALSUnangled Group, ALSUntangled no.18: apoeaquorin (Prevagen), 2013. Amyotroph Lateral Scier Frontotemporal Degener ; 14(1): 78-9.
2. Baimbridge, KG., Celio, MR., Rogers, JH. 1992. Calcium-binding proteins in nervous system. Trends in Neroscience . 15 : 303-8.
3. Brini, M, 2008. Calcium-sensitive photoproteins. Methods. 46: 160–66.
4. Cedervall, T., Berggard, T., Borek, V., et al. 2005. Redox sensitive cysteine residues in Calbindin D28K are structurally and functionally important. Biochem. 44: 684- 93.
5. Detert, JA., Adams, El., Lescher, JD., et al. 2013. Pretreatment with apoeaquorin protects hippocampal CA1 neurons from oxygen-glucose deprivation. PLoS One. 8(11): e79002.
6. Dikici, E., Qu, X., Rowe, L., et al. 2009. Aequorin variants with improved bioluminescence properties. Protein Eng. Des. Sel. 22(4): 243-48.
7. Frank, LA., Borisova, VV., Markova, SV., et al. 2008. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay, Anal. Bioanal. Chem. 391:2891–96.
8. Gifford, JL., Walsh, MP., Vogel, HJ. 2007. Structures and metal-ion binding properties of the Ca^{2+} binding helix-loop-helix EF-hand motifs. Biochem. J. 405: 199-221.
9. Head, JF., Inouye, S., Teranishi, K., et al. 2000. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. Nature. 405: 372–76.
10. Inouye, S. 2004. Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine. FEBS. 577 : 105–10.
11. Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., et al. 1985. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 82 : 3154-58.
12. Kendall, JM., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., et al. 1992. Engineering the Ca^{+2} activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. Biochem. Biophys. Res. Comm. 187(2): 1091-97.
13. Lambolez, B., Gibelin, N., Bourout, G., et al. 2005. Mutated photoproteins and their uses , European patent, EP 1404711.
14. Lewit-Bentley, A., Rety, S. 2000. EF-hand calcium binding proteins. Cuur. Opin. Struct. Biol. 10(6): 637-43.
15. Prasher, DC. 1992. Modified apoeaquorin having increased bioluminescence activity, U.S. patent, 5541309.
16. Prasher, D., McCann, RO., Cormier , MJ. 1985. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescence calcium-binding protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 126 : 1259–1268.
17. Quincy Bioscience, Prevagen quality of life study, Data on file, 2009. <http://quincybioscience.com/files/Aequorin-Protects-Adult-and-Aging-Hippocampal-CA1-Neurons-From-Ischemic-Cell-Death.pdf>
18. Shimomura, O., 1995. A short story of qequorin. Biol. Bull. 189 : 1-5.
19. Tricoire, L., Tsuzuki, K., Courjean, O., et al. 2006. Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis. PNAS. 103(25): 9500-5.
20. Tsuzuki, K., Tricoire, L., Courjean, O., et al. 2005. Thermostable mutants of the photoprotein aequorin obtained by in vitro evolution. J. Bio. Chem. 280(40) :34324-31.
21. Wu, X., Reid, RE., 1997. Structure/calcium affinity relationships of site III of calmodulin: testing the acid pair hypothesis using calmodulin mutants. Biochem. 36(28): 8649-56.
22. Yenar, MA., Minami, M., Sun, GH., et al. 2001. Calbindin D28K overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. Stroke. 32: 1028-35.
23. Zeinoddini, M., Khajeh, K., Hosseinkhani, S., et al. 2013. Stabilisation of Recombinant Aequorin by Polyols: Activity, Thermostability and

The role of Asn 28 and Lys 30 of aequorin photoprotein in calcium sensitivity

Esmaili Nezhad M.¹, Zeinoddini M.¹ and Maghsoudi N.²

¹ Bioscience and Biotechnology Dept., Malek Ashtar University of Technology, Tehran, I.R. of Iran

² Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti Medical Science University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The photoprotein aequorin, isolated from the jellyfish *Aequoera victoria*, is a calcium-sensitive bioluminescent protein formed with the apoprotein apoaequorin and the prosthetic group coelenterazine that emits light upon calcium binding. The protein is believed to be a monomer containing four helix-loop-helix motifs (EF hand) of which three domains can bind calcium. On the other hand, excess calcium in brain is associated with many neurodegenerative diseases and conditions including Alzheimer's, Parkinson's, and stroke. Aequorin as a natural calcium binding protein taking up excess calcium in brain cells much like a sponge. The aim of this study is production of mutant aequorin for calcium sensitivity increase. The mutated aequorin (N²⁸D, K³⁰T), in EF hand I, were prepared using site directed mutagenesis and subcloned in the pET21 expression vector. According to design of His-tag, purified mutants aequorin prepared using nickel affinity chromatography. Finally calcium sensitivity compared between wild-type and mutant aequorin. Calcium sensitivity of mutated aequorin indicated aeq-K³⁰T is more sensitive than wild type and aeq-N²⁸D.

Key words: photoprotein aequorin, mutation, calcium, sensitivity.