

## نقش پیش‌انکوباسیون در تشکیل کمپلکس سوپرامولکولی لوسیبجین با پاراسولفوناتوکلکس [4] آرِن در محیط کشت سلولی

ریحانه خسروی و امیر نوروزی\*

ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست‌فرآیند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴

### چکیده

رنگ فلورسانت لوسیبجین (LCG) به مولکول سبد مانند پاراسولفوناتوکلکس [4] آرِن یا CX4 متصل شده و ایجاد کمپلکس می‌کند. به موجب تشکیل کمپلکس CX4·LCG رنگ لوسیبجین دچار خاموشی فلورسانسی یا کوئینچ می‌شود. این کمپلکس برای جایگزینی مولکول لیگاند رقیب (به عنوان آنالیت (A)) با LCG مورد استفاده قرار می‌گیرد. طی "سنجش جایگزینی نشانگر" مولکول آنالیت با کمپلکس CX4·LCG انکوبه می‌شود و آنالیت جای لوسیبجین را گرفته، کمپلکس CX4·A تشکیل می‌شود و آزاد شدن LCG با افزایش نشر فلورسانس محلول همراه است. در این مطالعه یکبار CX4·LCG با پپتید تترآرژنین به عنوان آنالیت در بافر فسفات (محیط بدون لیگاند رقیب) پیش‌انکوبه شده و سپس با محیط کشت Ham's F12 (حاوی انواع لیگاندهای رقیب) رقیق شده است و میزان LCG آزاد شده از طریق روبش فلورسانسی اندازه‌گیری شد. بار دیگر کل فرآیند تشکیل کمپلکس CX4·LCG و انکوبه شدن با آنالیت تترآرژنین از ابتدا در محیط کشت و در حضور لیگاندهای رقیب انجام شده است و سپس محلول مورد روبش فلورسانسی قرار گرفته است. بر خلاف باور رایج نتایج دو آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند. به بیان دیگر ثابت اتصال دستخوش تغییر نمی‌شود. بنابراین برهم‌کنش‌های سوپرامولکولی در نهایت به تعادل چند جانبه می‌رسد و از روش "سنجش جایگزینی نشانگر" جهت سنجش آنالیت در محیط‌های همراه با لیگاندهای رقیب و مزاحم -از جمله محیط کشت که بسیار پرکاربرد و مورد توجه گرایش‌های مختلف زیستی است- هم می‌توان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: فلورسانس، آنالیت، برهم‌کنش سوپرامولکولی، سنجش جایگزینی نشانگر

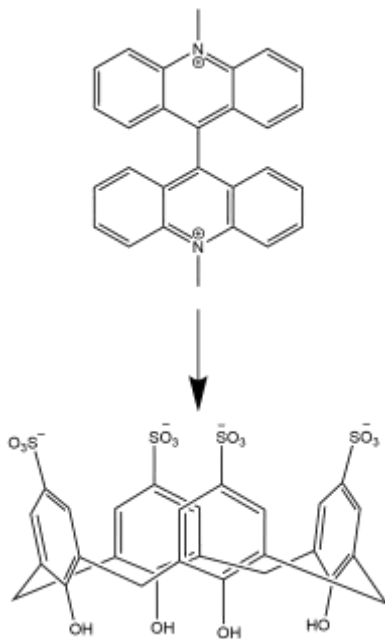
\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۴۹، پست الکترونیکی: [a\\_norouzy@nigeb.ac.ir](mailto:a_norouzy@nigeb.ac.ir)

### مقدمه

مانند با دهانه پهن و پایین باریک تر مشخص شده است (شکل ۱). به دلیل چرخش در اطراف گروه‌های متیلن، کلکسیرین می‌توانند به صورت کانفورماسیون‌های مختلفی وجود داشته باشند ولی با افزودن یک مولکول نسبتاً بزرگ با ممانعت فضایی زیاد در بالای حلقه برای قفل شدن ترکیب می‌توان از این چرخش جلوگیری کرد. علاوه بر این، از پل‌های مولکولی غالباً برای بی‌حرکتی ترکیبات کلکسیرین استفاده می‌شود. ساختار منعطف کلکسارن‌ها آنها را به میزبان‌های مولکولی مناسبی تبدیل

کلکسیرین‌ها (Calixarenes) کاملاً مشابه پایپلارن‌ها هستند و معمولاً از جفت شدن فنل با آلدهید حاصل می‌شوند. تفاوت عمده بین آنها در ساختار شیمیایی آنها است، جایی که کلکسیرین‌ها دارای یک ساختار سبد و پایپلارن‌ها دارای یک ساختار استوانه‌ای یا ستونی هستند. در نامگذار  $\text{calix}[n]\text{arene}$ ،  $n$  تعداد واحدهای تکرار شده در ساختارهای حلقوی است. ساختارهای کلکسارن با پراش سنجی اشعه ایکس مشخص شده است. در عکس‌های کریستالوگرافی کلکسیرین که یک ساختار سه بعدی سطل

انواع دیگر مولکول میهمانی که برای ترکیب با کالیکسارن استفاده می‌شوند، رنگهای آلی و مولکولهای کوچک بیولوژیکی هستند. ناو و همکاران از  $CX_n$  ( $n=4, 5$ ) برای ترکیب با انواع مولکولهای رنگ آلی برای سنجش کولین اکسیداز و استیل کولین استراز استفاده کردند. (۱۳) در یک بررسی توسط مارا و همکاران، استفاده از گلیکوزیدهای کلکسیرینی برای کاربردهای بیولوژیکی مورد بحث قرار گرفت. کالیکس متصل به فولات [۴] آرِن برای تحویل داروی ضد التهاب ایندومتاسین مورد استفاده قرار گرفته است. آزید حاوی هموکالیکس [۴] آرِن ابتدا قبل از ترکیب با اسید فولیک سنتز شد. گنجاندن داروی آبگریز ایندومتاسین با کلکسارن به عنوان سنتز، حلالیت آبی خوبی را نشان داد و می‌تواند برای تحویل بالقوه دارو مورد استفاده قرار گیرد. (۲۲)



شکل ۱- ساختار شیمیایی رنگ فلورسانت لوسیجین (بالا) و پارسولفوناتوکلکس[۴] آرِن یا CX4 (پایین). مسیر ورود لوسیجین به CX4 با فلش مشخص شده است.

لوسیجین (bis-N-methylacridinium nitrate) شاید متداول ترین پروب شیمیایی لومینسانس برای تشخیص سوپراکسید در سلول ها و بافت باشد. توجه به این نکته مهم است که در حضور ردوکتازهای سلولی درون زا،

کرده است زیرا در برهم کنش با مولکول میهمان می‌تواند ساختاری متناسب با شکل میهمان خود را به دست بیاورند تا برهمکنش های پایدار کننده بین مولکولی حداکثر شود. (۱۱)

اولین کلکسارن که با پراش سنجی اشعه ایکس تک کریستالی کشف شد کالیکس[۸] آرِن (Calix[8]arene) است که توسط آنگارو و همکاران سنتز شده است. در سال ۱۹۸۱ پس از آن، سایر کلکسارن ها با اندازه های چهار، پنج، شش، هفت، و هشت واحد تکرار نیز آماده شده است. (۱۱، ۱۸) سپس این کلکسیرین ها را می‌توان بیشتر در هوموکلکسیرین ها و هتروکلکسیرین ها دسته بندی کرد، به موجب آن اولی نشان دهنده واحدهای تکراری از همان نوع است و دومی نشان دهنده واحدهای تکراری از انواع مختلف است.

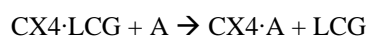
بسیاری از گروه های تحقیقاتی انواع مختلفی از کلکسیرین هارا برای تشکیل مجتمع های میزبان-مهمان در نظر گرفته اند. کلمن و همکاران سنتز  $p$ -sulfonatocalix[n]aren را با ابعاد  $n=4, 6, 8$  را سنتز کردند و امکان ایجاد کمپلکس آنها با اسیدهای آمینه مختلف مطالعه کردند. نتیجه گیری شد که گروههای عاملی در کلکسارن می‌توانند بر فعل و انفعالات آنها با اسیدهای آمینه تأثیر بگذارند. طبق مطالعه ایشان CX4 بیشترین قدرت اتصال را با آرژنین، لایزین و پرولین دارد. (۶) جدای از فعل و انفعالات با اسیدهای آمینه، کلکسیرین ها همچنین می‌توانند مجتمع هایی با یونهای فلزی تشکیل دهند. گروههای عملکردی خاص که در لبه کلکسیرین ها متصل می‌شوند، معمولاً در تثبیت کاتیون ها نقش دارند و مجموعه های میزبان-مهمان نهایی می‌توانند به عنوان سنسورهای نوری برای تشخیص فلزات مهم بالینی عمل کنند. (۹) بنابراین در محیط کشت سلولی که ۲۰ آمینواسید استاندارد و یونهای مختلف برای رشد و نمو سلولی وجود دارد بلقوه مولکول های میهمان مختلفی جهت اشغال حفره CX4 وجود دارد.

نشانگر با مولکول آنالیتی است که قابلیت اتصال به کلیکسیرین را دارد. روش سنجش جایگزینی نشانگر برای ارزیابی امکان اتصال و اندازه‌گیری قدرت اتصال انواع پپتیدها (۱۰، ۱۲، ۲۰)، پروتئین‌ها (۳) از جمله آنزیم‌های تثبیت شده (۱۴، ۱۶، ۱۷، ۱۹) و سایر بیومولکول‌ها (۵، ۱۵، ۲۱) به مولکول CX4 می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. مولکول کلیکسیرین به نوبه خود می‌تواند نفوذپذیری سلولی مواد متصل به خود را افزایش دهد. (۱۳) لذا اتصال کلیکسیرین به مولکول میزبان راهگشای افزایش نفوذپذیری مولکول میهمان است. در این مطالعه به این پرسش پاسخ خواهیم داد در محیط‌هایی که علاوه بر مولکول میهمان (خواه با هدف حمل شونده‌گی یا آنالیتی) سایر مولکول‌های میهمان به عنوان رقیب ناخواسته وجود دارند، چه تاثیری بر ثابت اتصال تام خواهد داشت و اینکه آیا سجن در چنین محیطی امکان پذیر می‌باشد یا خیر.

### مواد و روشها

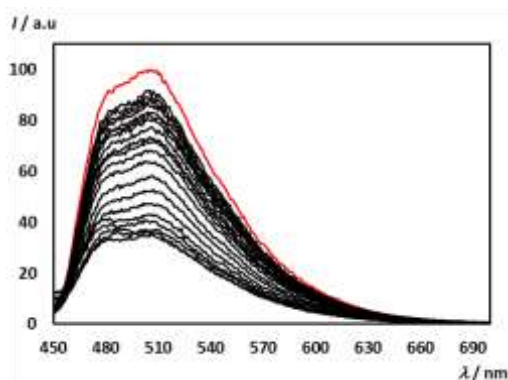
تمامی مواد شیمیایی به کار رفته از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند. محیط کشت به کار رفته از نوع Ham's F12 به همراه ۱۰٪ سرم گاوی بوده است. انکوباسیون‌ها به مدت حدوداً ۱۰ ثانیه و صرفاً با هم خوردن توسط ورتکس انجام شده‌اند. دمای آزمایشگاه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد ثابت بوده است. بافر فسفات از امتزاج سدیم دی‌هیدروژن فسفات و دی‌سدیم هیدروژن فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار تهیه شده و متعاقباً اسیدیته بافر در  $\text{pH} = 7.4$  تنظیم شده است. به منظور به حداقل رساندن پراش ناشی از ذرات معلق، بافر قبل از استفاده با سانتریفیوژ با دور ۳۴۰۰ سانتریفیوژ شده و هر گونه ذرات معلق احتمالی و ناخالصی‌های نامحلول رسوب داده شده‌اند. محلول رویی جهت پیش‌انکوباسیون کلیکسیرین و لوسيجين مورد استفاده قرار گرفته است. برای روبش فلورسانسی از اسپکتروفلوریمتر واریان کری-اکلیپس استفاده شد. لوسيجين در طول موج ۳۶۹ نانومتر تهییج شده و نشر آن

لوسيجين در یک چرخه اکسایش-کاهش شرکت می‌کند که می‌تواند منجر به تولید مستقیم سوپراکسید توسط پروب شود. علی‌رغم استفاده معمول از آن در زمینه زیست‌شناسی اکسیداسیون-احیا بحث بر سر این که آیا لوسيجين یک پروب مناسب برای تشخیص تولید گونه‌های رادیکال آزاد است وجود دارد. با این حال، مطالعات اعتبارسنجی با استفاده از طیف گسترده‌ای از تکنیک‌ها برای تولید سوپراکسید نشان می‌دهد که اکسیداسیون اتوماتیک در غلظت‌های لوسيجين ۱-۵ میکرومولار رخ نمی‌دهد. برای انواع سلول‌ها، غلظت ۵ میکرومولار برای تشخیص سوپراکسید کافی است و نباید از غلظت‌های بالاتر استفاده شود. رنگ فلورسانس لوسيجين (شکل ۱) قابلیت ورود به حفره کلیکسیرین به عنوان مولکول میهمان را دارد. در اثر این جایگزینی لوسيجين دچار خاموشی فلورسانس (کوئینچ) می‌شود. (۱۳) از آنجا که اتصال مولکول‌های میهمان گفته شده مانند آمینو اسیدها، یونها، ترکیبات آلی و غیره به CX4 نشانه یا سیگنال خاصی به جای نمی‌گذارد لذا اندازه‌گیری این اتصال به سادگی قابل تشخیص نیست. ولی با کمک رنگ لوسيجين می‌توان مطابق واکنش زیر کمپلکس CX4·LCG را در معرض مولکول متصل شونده یا آنالیت قرار داد:

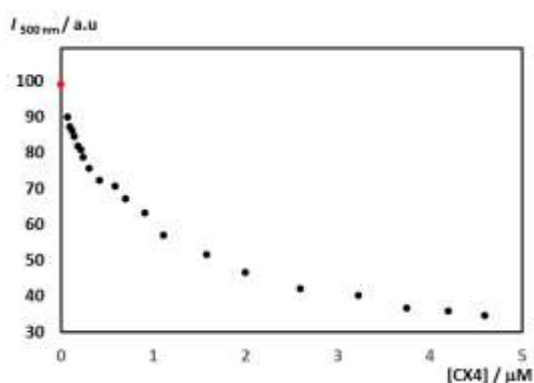


لوسيجين آزاد شده قابلیت نشر فلورسانس دارد. بنابراین اتصال آنالیت به کلیکسیرین نهایتاً منجر به افزایش نشر در محلول می‌شود. به این روش "سنجش جایگزینی نشانگر" یا سجن ((Indicator Displacement Assay (IDA) می‌گویند. در این روش، یک مولکول آنالیت جایگزین مولکول نشانگر متصل به مولکول میزبان می‌شود. با این جایگزینی، نشانگر، نشانه‌ای از خود به جای می‌گذارد که می‌تواند بعنوان مثال تغییر در شدت فلورسانس و یا جذب ماوراء بنفش-مرئی در طول موج خاصی باشد. مولکول نشانگر در اینجا رنگ لوسيجين است و سنجش بر مبنای جایگزینی

(الف)

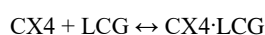


(ب)



شکل ۲-الف) طیف نشر فلورسانس لوسیجین ۱۰ میکرومولار (قرمز) به تنهایی و همراه با غلظت‌های فزاینده CX4 (مشکی) تهیه شده در طول موج ۳۷۰ نانومتر و ب) میزان افت شدت فلورسانس در طول موج ۵۰۰ نانومتر بر علیه غلظت‌های CX4

آرژنین از بین همه اسیدهای آمینه بیشترین توان اتصال به کلیکسیرین را دارد. (۶) کولین، استیل کولین و پپتید پروتامین هم این ویژگی را دارند. (۱۳) شکل ۳ نشر اندک کمپلکس CX4·LCG را نشان می‌دهد که در آن غلظت [LCG] = 5 μM در حضور [CX4] = 10 μM بوده است. به دلیل ماهیت سوپرامولکولی اتصال لوسیجین به کلیکسیرین، تشکیل کمپلکس یک واکنش برگشت پذیر است:



بنابراین علی‌رغم این که استوکیومتری واکنش سوپرامولکولی لوسیجین با کلیکسیرین ۱:۱ است اما استفاده از غلظت دو برابری کلیکسیرین واکنش را طبق اصل لوشاتالیه به سمت راست می‌برد و تعداد مولکول لوسیجین بیشتری به فرم کمپلکس در می‌آیند که نتایجاً

در محدوده ۳۸۰ تا ۸۰۰ نانومتر مورد روبش قرار گرفته است. کووت استفاده شده از نوع کوارتز با حجم ۱/۴ میلی لیتر بوده است. پنجره‌های تهییج و نشر به عرض ۵ نانومتر و سرعت روبش متوسط بوده است.

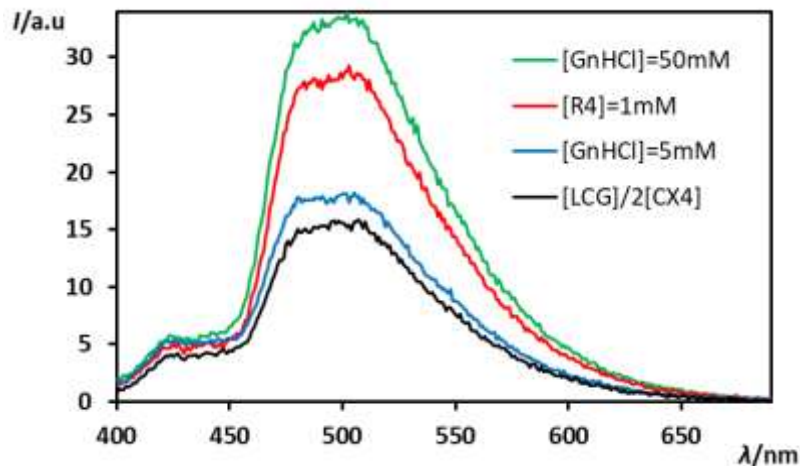
## نتایج

ناو و همکاران به تفصیل نحوه خاموشی فلورسانس لوسیجین توسط CX4 را توضیح دادند. (۷) تشکیل کمپلکس‌های میهمان-میزبان بین در (n = 4-5) در CXn و LCG با تکنیک‌های طیف‌سنجی نوری، NMR، ولتامتری چرخه‌ای، ITC و کریستالوگرافی با اشعه ایکس مورد مطالعه قرار گرفتند. این رنگ با ثابت اتصال نسبتاً قوی  $k_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$  به CXn‌های مذکور متصل شد. مکانیسم خاموشی یک نوع انتقال الکترون گرمازا است که منجر به خاموشی استاتیک با فاکتور ۱۴۰ می‌شود. بنابراین CX4 یک خاموش‌کننده قوی فلورسانس لوسیجین محسوب می‌شود. در شکل ۲ نشر لوسیجین به تنهایی و نحوه خاموشی آن با اضافه شدن مقادیر مختلف CX4 محلول در بافر فسفات به نمایش در آمده است. به منظور حذف اثر رقّت، محلول غلیظ CX4 اضافه شده حاوی لوسیجین در غلظت برابر با محلول لوسیجین تنها (منحنی قرمز) بوده است. به این ترتیب با اضافه کردن محلول فوق به لوسیجین موجود در کووت فلورسانس، غلظت لوسیجین ثابت مانده ولی غلظت CX4 با هر بار اضافه کردن افزایش می‌یابد.

ترکیبات مختلف آلی و معدنی امکان اتصال به کلیکسیرین را دارند. از جمله کاتیون‌ها می‌توان به عناصر کمیاب جدول تناوبی مانند  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  و  $\text{Yb}^{3+}$  و همچنین یون‌های بی‌والان مانند کلسیم و منیزیم اشاره کرد (۴). در بین ترکیبات آلی اسیدهای آمینه لوسین، پرولین، تریپتوفان، فیل آلانین، اسپاراتات، سرین، لیزین، آرژنین و هیستیدین توانایی اتصال به CX4 را دارند.

آزاد متصل خواهد شد. رها شدن لوسیجین که با افزایش نشر همراه است در غلظت‌های آنالیت تترآرژنین با غلظت یک میلی مولار و آنالیت گوانیدین هیدروکلرید با غلظت‌های ۵ و ۵۰ میلی مولار در شکل ۳ قابل مشاهده است.

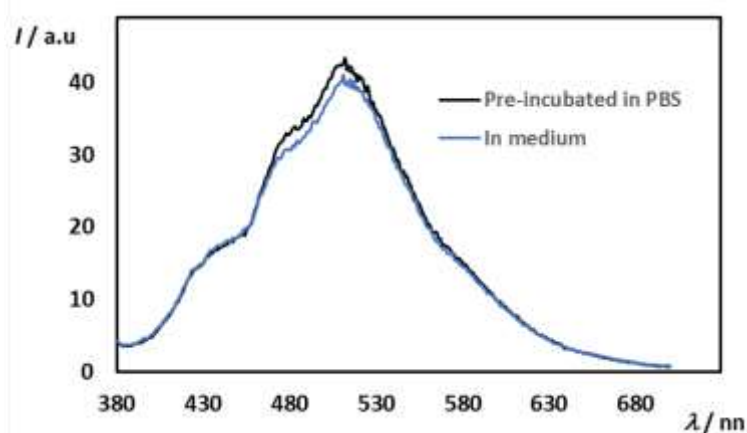
خاموشی بیشتری هم گزارش می‌شود. هر چند اضافه کردن کلیکس‌رین بیشتر خاموشی بیشتری هم در پی دارد ولی در این صورت محلول حاصل با تجمع کلیکس‌رین‌های خالی بیشتری نیز همراه است و در مرحله بعد که آنالیت اضافه می‌شود به جای جایگزین با لوسیجین به کلیکس‌رین‌های



شکل ۳- طیف نشر فلورسانس سنجش جایگزینی نشانگر. آزاد شدن لوسیجین از کمپلکس CX4-LCG توسط جایگزینی با آنالیت‌های پپتید تترآرژنین R4 و گوانیدین هیدروکلرید (Gn-HCl) با افزایش نشر فلورسانس همراه است.

آنالیتی انکوبه شد و سپس به کمپلکس CX4-LCG حاصل پپتید تترآرژنین اضافه شد. نهایتاً کل محلول با محیط کشت (حاوی متصل‌شونده‌های غیر اختصاصی) رقیق شده و به غلظت یکسان در حالت قبلی رسید (منحنی مشکی در شکل ۴). به بیان دیگر غلظت نهایی کمپلکس و آنالیت در هر دو محلول یکسان بوده است.

به منظور مشاهده میزان اتصال لوسیجین به کلیکس‌رین در حضور رقبا غیر آنالیتی (ناخواسته)، ۱۰ میکرومولار کلیکس‌رین با ۵ میکرومولار لوسیجین در محیط کشت با همدیگر انکوبه شدند و سپس آنالیت تترآرژنین با غلظت ۱ میلی مولار به آن اضافه شد (منحنی آبی در شکل ۴). در آزمایش دیگری کلیکس‌رین با لوسیجین در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار بدون حضور انواع رقبا غیر



شکل ۴- طیف نشر لوسیجین آزاد شده از کمپلکس CX4-LCG انکوبه شده در بافر فسفات و رهایش در محیط کشت (منحنی مشکی) و یا انکوباسیون و رهایش در محیط کشت (منحنی آبی).

## بحث

میهمان اشغال شده باشد. آزمایش ما نشان می‌دهد که این روش کارایی ناچیزی در حفظ لوسیعین به عنوان مولکول میهمان دارد (شکل ۴). علت این امر برگشت پذیر بودن هر گونه اتصال سوپرامولکولی به کلیکسین است خواه با مولکول میهمان خواه با مولکول رقیب. بنابراین یک تعادل چند گانه مطابق شکل ۵ تشکیل می‌شود.

در مقایسه شکل ۴ با شکل ۳ متوجه می‌شویم که نه تنها شکل طیف‌های فلورسانسی در محیط کشت تغییر یافته اند بلکه طول موج قله هم از حدود ۵۰۰ نانومتر در شکل ۳ به ۵۳۰ نانومتر در شکل ۴ تغییر کرده است. به این پدیده شیفت استوک می‌گویند و در نتیجه فاصله انرژی بین الکترون جهش یافته در حالت تهییج شده با سطح پایه افزایش یافته است و این افزایش خود را به صورت کاهش سطح انرژی الکترون در حالت پایه در بافر فسفات با طول موج بیشینه نشر در ۵۰۰ نانومتر نسبت به محیط کشت که سطحی انرژی پایتتری دارد به نحوی که طول موج بیشینه نشر در ۵۳۰ نانومتر مشاهده شده است، نشان می‌دهد.

پتیدها کاربردهای گسترده‌ای در زیست‌شناسی و پزشکی دارند (۱، ۲). پتیدهای اوکتا و نونا آرژنینی به ترتیب با دارا بودن ۸ و ۹ آرژنین جزء پتیدهای نفوذ کننده سلولی شناخته شده می‌باشند. پتیدها نفوذ کننده به داخل سلول بر خلاف آنچه از نام آنها بر می‌آید فقط به سلول ورود نمی‌کنند بلکه همگی آنها حامل هم هستند. حمل شونده می‌تواند پروتئین‌ها، دارو‌ها و ترکیبات عکس برداری از سلول باشند که به تنهایی نفوذپذیری کمی دارند اما با کمک این پتیدها مشکل نفوذ آنها به سلول یا بافت از بین می‌رود. اشکال عمده در استفاده از الیگوارژنین‌ها یکی سمیت آنها برای سلول است و دیگری دشواری سنتز آنها. سمیت آنها به دلیل مکانیسم نفوذ آنها است. طبق مقالات موجود نفوذ آنها با دو مکانیسم اندوسیتوز و نفوذ مستقیم از غشاء انجام می‌شود. به نظر می‌رسد مکانیسم نفوذ مستقیم که برای اولین بار توسط گارسیا و دیگران گزارش

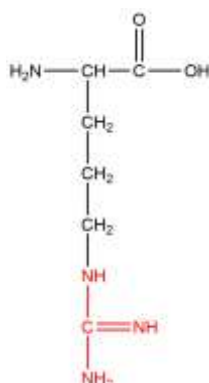
در کمپلکس‌های سوپرامولکولی اتصال غیر کووالانسی (مانند پیوندهای واندروالسی، لاندن و هیدروژنی) بین لیگاند و رسپتور برقرار است. در صورتی که در آب خالص و یا بافرهای ساده از این کمپلکس‌ها استفاده شود، تنها دو جزء لیگاند و رسپتور امکان تشکیل کمپلکس را دارند و ثابت اتصال آنها عددی ثابت است. اما در صورت نیاز به استفاده از این کمپلکس‌ها به عنوان حامل دارو نیاز است محیط کشت به عنوان محلول مورد استفاده قرار بگیرد تا امکان ساعت‌ها و روزها انکوباسیون با سلول‌ها وجود داشته باشد. همانطور که در مقدمه گفته شد، کلیکسین‌ها یکی از انواع رسپتورها می‌باشند. مشکل عمده در استفاده از میزبان کلیکسین به عنوان حامل برای پتیدها، آنزیمها، و سایر ملکول‌های میهمان (حمل شونده) این است که این مواد بایستی در محیط کشت حل شوند و سلول در محیط کشت است که می‌تواند با این مواد مواجه شود. مشکل اینجاست که محیط کشت شامل رقبای مولکولی مختلف جهت اشغال حفره کلیکسین می‌باشد. لذا اتصال مولکول میهمان در رقابت با سایر مولکول‌ها موجب تضعیف ثابت اتصال میهمان می‌شود به بیان دیگر در تعادل زیر که در آن A مولکول میهمان یا آنالیت و C مولکول رقیب است، بخشی بزرگتری از مولکول میهمان به صورت آزاد در محلول وجود خواهد داشت تا در آب خالص.



شکل ۵- واکنش سوپرامولکولی و برگشت پذیر کلیکسین با آنالیت (مولکول میهمان) و مولکول رقیب

یکی از راهکارهایی که در برخی منابع شنیده شده است این است که کمپلکس CX4·A در محیط آبی مانند بافر فسفات ایجاد شود و سپس به محیط کشت اضافه شود تا همزمان مولکول رقیب و میهمان شانس رقابت نداشته باشند و به اصطلاح حفره کلیکسین از قبل توسط مولکول

گوانیدینو در محلول ۱ میلی مولار تترآرژنین برابر ۴ میلی مولار است.



شکل ۶- ساختار شیمیایی آمینو اسید آرژنین. گروه گوانیدینو در زنجیره جانبی به رنگ قرمز مشخص شده است.

با این حال افزایش نشر به مراتب بیشتر از محلول ۵ میلی مولار گوانیدین هیدروکلرید است. در نتیجه فقط گروه گوانیدینو نیست که زنجیره جانبی را به کلیکسین متصل می‌کند بلکه، گروه تری متیلن زنجیره جانبی هم نقش مهمی در اتصال زنجیره جانبی آرژنین به کلیکسین دارد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در قالب طرح ۷۳۹ به انجام رسیده است که بدینوسیله نویسندگان لازم می‌دانند از پژوهشگاه مذکور تقدیر و تشکر نمایند.

شد (۸) نقش بیشتری در سمیت الیگو آرژنین‌ها داشته باشد زیرا در نفوذ مستقیم حفراتی در سطح سلول توسط الیگوآرژنین ایجاد می‌شود. دیواره این حفرات از جنس فسفولیپید غشایی با بار منفی است که در برهم کنش الکتروستاتیک با الیگوآرژنین، امکان نفوذ آنرا فراهم می‌آورد. مشاهدات ما در مطالعات گذشته (۱۳) نشان داده است که استفاده از پپتیدهای غنی از آرژنین مانند پروتامین به محض اضافه شدن باعث نکروز سلولی می‌شوند. به منظور کاستن از خواص سمی آرژنین می‌توان از حامل CX4 برای حمل آن به داخل سلول استفاده کرد. اتصال پپتید تترآرژنین به CX4 توسط روش سجن در شکل ۳ به نمایش در آمده است. به نظر می‌رسد به دلیل وجود سولفات‌های بار منفی در حاشیه بالایی کلیکسین (شکل ۱) اتصال آرژنین از ناحیه گروه گوانیدینوی زنجیره جانبی باشد (شکل ۶).

به منظور اثبات این فرضیه اتصال گوانیدین هیدروکلرید و پپتید تترآرژنین به کلیکسین توسط روش سجن به صورت مجزا بررسی شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که هر دو مولکول توانایی اتصال به کلیکسین را دارند ولی تترآرژنین در غلظت ۱ میلی مولار رهایش تعداد بیشتری مولکول لوسیجین را باعث می‌شود تا گوانیدین هیدروکلرید در غلظت ۵ میلی مولار. تترآرژنین دارای چهار گروه گوانیدینو می‌باشد و غلظت گروه‌های

### منابع

۲- لیلای ز. م. الهه ز. ح. (۱۳۹۷). "تجزیه و تحلیل آماری پپتیدهای ضدسرطان گیاهی با استفاده از محیط *R*". مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۳۱(۳): ۳۱۲-۳۲۴.

۱- فاطمه د. (۱۳۹۳). "استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*)". مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۷(۲): ۲۱۱-۲۲۳.

3- Abdali, N., Barth E., Norouzy A., Schulz R., Nau W. M., Kleinekathöfer U., Tauch A. and Benz R. (2013). "Corynebacterium jeikeium jk0268 constitutes for the 40 amino acid long PorAC<sub>j</sub>, which forms a homooligomeric and anion-selective cell wall channel." PloS one 8(10): e75651.

4- Bonal, C., Israëli Y., Morel J.-P. and Morel-Desrosiers N. (2001). "Binding of inorganic and organic cations by p-sulfonatocalix[4]arene in water: a thermodynamic study" Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2(7): 1075-1078.

5- Carvalho, C. P., Norouzy A., Ribeiro V., Nau W. M. and Pischel U. (2015). "Cucurbiturils as

- supramolecular inhibitors of DNA restriction by type II endonucleases." *Organic & biomolecular chemistry* **13**(10): 2866-2869.
- 6- Da Silva, E. and Coleman A. W. (2003). "Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arenes." *Tetrahedron* **59**(37): 7357-7364.
- 7- Guo, D.-S., Uzunova V. D., Su X., Liu Y. and Nau W. M. (2011). "Operational calixarene-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions." *Chemical Science* **2**(9): 1722-1734.
- 8- Herce, H. D., Garcia A. E. and Cardoso M. C. (2014). "Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules." *J Am Chem Soc* **136**(50): 17459-17467.
- 9- Ikeda, A. and Shinkai S. (1997). "Novel Cavity Design Using Calix[n]arene Skeletons: Toward Molecular Recognition and Metal Binding." *Chemical Reviews* **97**(5): 1713-1734.
- 10- Jacob, M. H., Dsouza R. N., Ghosh I., Norouzy A., Schwarzlose T. and Nau W. M. (2012). "Diffusion-enhanced Förster resonance energy transfer and the effects of external quenchers and the donor quantum yield." *The Journal of Physical Chemistry B* **117**(1): 185-198.
- 11- Martino, M., Gregoli L., Gaeta C. and Neri P. (2002). "Regioselective O-Substitution of p-tert-Butylcalix[7]arene." *Organic Letters* **4**(9): 1531-1534.
- 12- Norouzy, A., Assaf K. I., Zhang S., Jacob M. H. and Nau W. M. (2014). "Coulomb Repulsion in Short Polypeptides." *The Journal of Physical Chemistry B* **119**(1): 33-43.
- 13- Norouzy, A., Azizi Z. and Nau W. M. (2015). "Indicator displacement assays inside live cells." *Angewandte Chemie International Edition* **54**(3): 792-795.
- 14- Norouzy, A., Habibi-Rezaei M., Qujeq D., Vatani M. and Badiie A. (2010). "Adsorptive immobilization of acetylcholine esterase on octadecyl substituted porous silica: optical bioanalysis of carbaryl." *Bulletin of the Korean Chemical Society* **31**(1): 157-161.
- 15- Norouzy, A. and Nau W. (2014). "Synthetic macrocyclic receptors as tools in drug delivery and drug discovery." *Drug Target Review*.
- 16- Norouzy, A., Qujeq D. and Habibi-Rezaei M. (2009). "The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase." *Reaction Kinetics and Catalysis Letters* **98**(2): 391.
- 17- Norouzy, A., Qujeq D. and Habibi-Rezaei M. (2015). "Evaluation and Characterization of Free and Immobilized Acetylcholinesterase with Fluorescent Probe, Differential Scanning Calorimetry and Docking." *International Biological and Biomedical Journal* **1**(3): 103-111.
- 18- Ogoshi, T., Kitajima K., Yamagishi T.-a. and Nakamoto Y. (2010). "Synthesis and Conformational Characteristics of Nonsymmetric Pillar[5]arene." *Organic Letters* **12**(3): 636-638.
- 19- Qujeq, D., Roushan T., Norouzy A., Habibi-Rezaei M. and Mehdinejad-Shani M. (2012). "Effects of dichlorvos and carbaryl on the activity of free and immobilized acetylcholinesterase." *Toxicology and Industrial Health* **28**(4): 291-295.
- 20- Shahabi, M., Hajihosseini R., Nau W. M., Noghabi K. A. and Norouzy A. (2020). "Augmenting Peptide Flexibility by Inserting Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Their Sequence." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.
- 21- Shakibaie, M., Tabandeh F., Shariati P. and Norouzy A. (2018). "Synthesis of a thin-layer gelatin nanofiber mat for cultivating retinal cell." *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **33**(4): 371-381.
- 22- Tan, S. Y., Ang C. Y. and Zhao Y. (2017). 5.17 - Smart Therapeutics Achieved via Host-Guest Assemblies. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*. J. L. Atwood. Oxford, Elsevier: 391-420.

# The Role of Pre-incubation in Formation of Supramolecular Complex Between Lucigenin and *p*-Sulfonatocalix[4]arene in Cell Culture Medium

Khosravi R. and Norouzy A.\*

Dept of Bioprocess Engineering, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran. I.R. of Iran

## Abstract

Lucigenin (LCG) is a fluorescent dye that can form supramolecular complex with *p*-Sulfonatocalix[4]arene by doing a simple incubation. By formation of CX4·LCG complex, fluorescence intensity of LCG is quenched. The complex is used in indicator displacement assay (IDA), in which an analyte (A) is incubated with the CX4·LCG complex, the A then displaces LCG and CX4·A complex forms in real time. The liberated LCG regains its fluorescence. In cell culture medium there are ample of competitor ligand molecules for LCG. The presence of competitors decreases the association constant ( $k_a$ ) of LCG to CX4. In this study, the CX4·LCG complex were pre-incubated with tetra-arginine peptide in phosphate buffer, a solution devoid of any competitor molecule, prior to dilution with the cell culture medium to the desired concentration. The fluorescence intensity of the solution was measured hoping for maximum fluorescence recovery. Next time, all incubations were performed in the medium then the fluorescence was measured. Contrary to popular belief, two experiments did not show a significant difference *i.e.*, the  $k_a$  value remains unchanged. We concluded that the supramolecular interactions will come to a multi-lateral equilibrium; therefore, IDA can be used for monitoring and measuring the concentration of analyte-of-interest even in the presence of competitors in the cell culture medium which is an interesting solvent in many biological sciences.

**Keywords:** Fluorescence, Analyte, Supramolecular interaction, Indicator displacement assay