New Researches in the Smart City
Vol 3 (Issue 2), 69-76
nrsc.apadana.ac.ir

Apadana Institute of Higher Education

Enhancing the Thermal Stability and Performance of Bst DNA Polymerase Through Protein Engineering and Machine Learning

Marjan Rahbar *

MSc Student, Department of Biology, Faculty of Converging Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Received: 07/December/2024 Accepted: 18/February/2025 eISSN: 3060-6144 ISSN: 2980-8936

Abstract

Bst DNA polymerase is a key enzyme used in isothermal amplification techniques such as LAMP due to its strong strand displacement activity. However, its limited thermal stability and reduced efficiency at elevated temperatures pose challenges for its broader application in molecular diagnostics. In this study, we employed a combined engineering approach to enhance Bst DNAP performance. A fast-folding HP47 domain from villin was fused to the enzyme, significantly improving stability and purification efficiency. Additionally, a machine learning algorithm (MutCompute) was used to predict stabilizing mutations, leading to a 2.5°C increase in denaturation temperature and enabling LAMP reactions to proceed at 73°C, a temperature at which Bst 2.0 loses functionality. Furthermore, the engineered variants reduced reaction times by up to 10 minutes, improving overall efficiency. These findings demonstrate the potential of machine learning-driven enzyme engineering to develop highly thermostable enzymes for biotechnology and infectious disease diagnostics.

Keywords: Bst DNA polymerase, isothermal amplification, LAMP, thermal stability, machine learning, enzyme engineering, directed mutagenesis, biotechnology, molecular diagnostics

* Corresponding Author: rahnarmarjan58@gmail.com

فصلنامه پژوهش‌های نوین در شهر هوشمند
دوره ۳، شماره ۲، زمستان ۱۴۰۳، ۶۹-۷۶
nrsc.apadana.ac.ir

مؤسسه آموزش عالی آپادانا
غیر دولتی - غیر انتفاعی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۳۰ eISSN: 3060-6144 ISSN: 2980-8936

بهبود پایداری حرارتی و عملکرد Bst DNA پلیمراز با ترکیب مهندسی پروتئین و یادگیری ماشین

مرجان رهبر*

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

چکیده

Bst DNA پلیمراز، آنزیم اصلی مورد استفاده در روش‌های تکثیر هم‌دما مانند LAMP، به دلیل قابلیت جایگزینی رشته‌ای بالا در کاربردهای زیستی و تشخیصی استفاده می‌شود. بااین‌حال، محدودیت‌هایی مانند پایداری حرارتی پایین و کاهش کارایی در دماهای بالا موجب شده است که استفاده از آن در شرایط سخت‌تر با چالش‌هایی همراه باشد. در این پژوهش، یک رویکرد مهندسی ترکیبی برای بهبود عملکرد Bst DNAP ارائه شده است. ابتدا، یک دومین سریع‌تاشونده (HP47) از پروتئین villin به آنزیم متصل شد که موجب افزایش پایداری و سهولت خالص‌سازی آن گردید. سپس، یک الگوریتم یادگیری ماشین (MutCompute) برای شناسایی جهش‌های بهینه به‌منظور افزایش پایداری حرارتی مورد استفاده قرار گرفت. جهش‌های منتخب به‌طور افزایشی موجب افزایش دمای دناتوراسیون تا ۲٫۵ درجه سانتی‌گراد شدند و امکان انجام واکنش‌های LAMP را در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد فراهم کردند؛ درحالی‌که Bst 2.0 در این دما غیرفعال شد. همچنین، واریانت‌های طراحی‌شده، زمان موردنیاز برای تکثیر را تا ۱۰ دقیقه کاهش دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که استفاده از یادگیری ماشین در طراحی آنزیم‌های مقاوم به حرارت می‌تواند کاربردهای گسترده‌ای در زیست‌فناوری و تشخیص بیماری‌های عفونی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: Bst DNA پلیمراز، تکثیر هم‌دما، LAMP، پایداری حرارتی، یادگیری ماشین، مهندسی آنزیم، جهش‌زایی هدفمند، زیست‌فناوری، تشخیص مولکولی

* نویسندهٔ مسئول: rahnarmarjan58@gmail.com

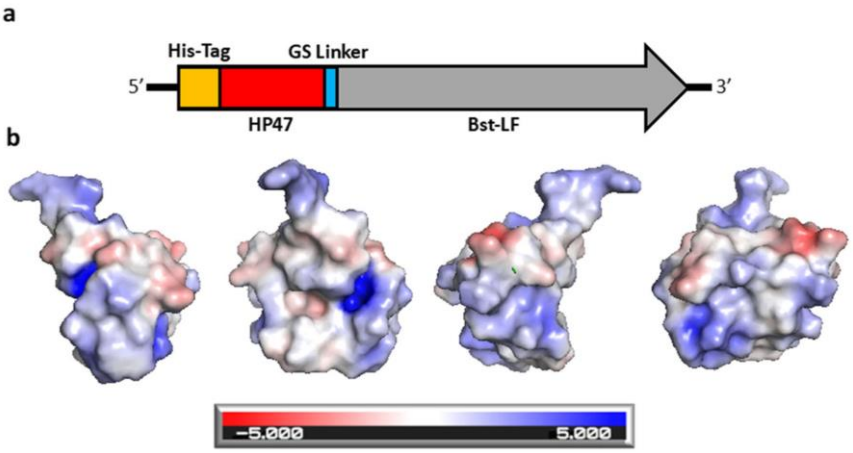
مقدمه

آنزیم DNA پلیمراز I از Geobacillus stearothermophilus (که به‌عنوان Bst DNAP نیز شناخته می‌شود) به دلیل ویژگی جابه‌جایی رشته (strand displacement) بالا، به‌طور گسترده در واکنش‌های تکثیر هم‌دما مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aliotta et al., 1996). این ویژگی، Bst DNAP را به گزینه‌ای ایده‌آل برای واکنش تکثیر هم‌دما با واسطه حلقه (LAMP) تبدیل کرده است که به‌عنوان یک روش تشخیصی سریع و حساس در زمینه‌هایی مانند تشخیص ویروس SARS-CoV-2 به کار گرفته شده است (Notomi et al., 2000; Park et al., 2020). مزیت LAMP نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) این است که نیازی به چرخه‌های دمایی ندارد؛ بنابراین، استفاده از آن در محیط‌های بالینی و میدانی ساده‌تر است (Huang et al., 2020).

اگرچه Bst DNAP به‌طور گسترده در کاربردهای بیوتکنولوژی و تشخیصی مورد استفاده قرار گرفته است؛ اما مطالعات محدودی بر روی مهندسی این آنزیم با هدف بهبود خواص بیوفیزیکی و سینتیکی آن انجام شده است (Coulther et al., 2019; Nikoomanzar et al., 2020). در تحقیقات قبلی، بیشتر تغییرات اعمال‌شده در این آنزیم محدود به جهش‌های خاص در جایگاه فعال آن بوده است (Ma et al., 2016; Sandalli et al., 2009). بااین‌حال، افزایش دمای عملکردی آنزیم می‌تواند موجب بهبود سرعت تکثیر و کاهش آلودگی‌های غیر اختصاصی در واکنش‌های LAMP شود. این امر نیازمند طراحی و بهینه‌سازی جدید در ساختار آنزیم است (Piotrowski et al., 2019).

در این مطالعه، یک رویکرد مبتنی بر یادگیری ماشین برای مهندسی Bst DNAP به‌منظور بهبود پایداری حرارتی آن ارائه شده است. روش پیشنهادی شامل ارزیابی تطابق شیمیایی اسیدهای آمینه در محیط‌های میکروساختاری و پیش‌بینی جهش‌هایی است که می‌توانند موجب افزایش پایداری حرارتی آنزیم شوند (Torng & Altman, 2017). این استراتژی قبلاً برای بهینه‌سازی پروتئین‌هایی مانند آنزیم فسفومانوز ایزومراز و β-لاکتاماز TEM-1 موفقیت‌آمیز بوده است (Shroff et al., 2020).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که واریانت‌های طراحی‌شده از طریق یادگیری ماشین، پایداری حرارتی بهتری نسبت به آنزیم والد دارند. برخی از جهش‌های ترکیبی موجب افزایش دمای دناتوراسیون تا ۲٫۵ درجه سانتی‌گراد شدند و امکان انجام واکنش‌های LAMP را در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد فراهم کردند؛ درحالی‌که Bst DNAP استاندارد در این دما غیرفعال می‌شود. به‌طورکلی، این پژوهش یکی از اولین نمونه‌هایی است که در آن از یادگیری ماشین بدون نظارت برای بهینه‌سازی پایداری حرارتی یک آنزیم استفاده شده است.



شکل ۱. نمایش گرافیکی Br512 و نقشه نیروی الکترواستاتیک HP47

مروری بر ادبیات موضوع و روش‌ها

مواد و معرف‌ها

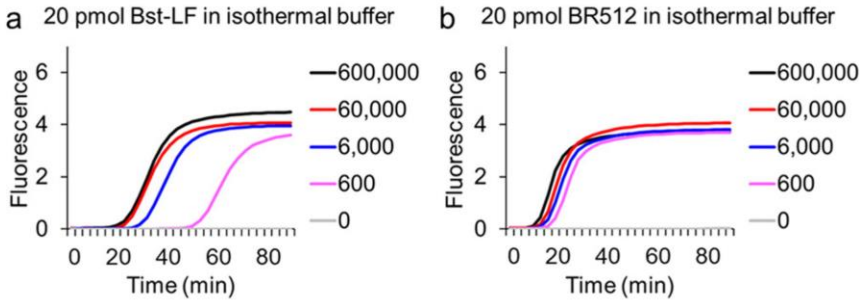
تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از گرید تحلیلی برخوردار بوده و از شرکت Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) تهیه شده‌اند؛ مگر در مواردی که به‌طور مشخص ذکر شده است. آنزیم‌های تجاری و بافرهای مرتبط از شرکت New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA) خریداری شدند. تمامی الیگونوکلئوتیدها و بلوک‌های ژنی مورد استفاده از Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) تأمین شدند.

تخلیص آنزیم Br512 و واریانت‌های آن

ژن Br512 (شکل ۱) در یک وکتور بیانی اختصاصی E. coli تحت کنترل پروموتر T7 RNA پلیمراز (پلاسمید pKAR2) کلون شد. این پلاسمید و واریانت‌های جهش‌یافته آن به باکتری E. coli BL21(DE3) منتقل شده و پس از رشد در محیط سوپریور براث (Athena Enzyme Systems) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به OD600 حدود ۰/۷–۰/۸، القای بیان پروتئین با ۱ میلی‌مولار IPTG و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر آنهیدروتتراسایکلین (aTc) در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. سلول‌های القاشده با سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی‌گراد، جمع‌آوری و در محلول لیز اختصاصی شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.5)، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۰/۱٪ Igepal CO-630، و مهارکننده‌های پروتئازی، حل شدند. لیز سلولی با سونیکاسیون انجام شد و سپس، پروتئین‌ها با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی فلزی (Ni-NTA) تخلیص گردیدند. خلوص پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی Coomassie مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش LAMP و خوانش در زمان واقعی

واکنش‌های LAMP-OSD در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مقادیر مشخصی از DNA الگو، پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن GAPDH و آنزیم‌های Bst-LF، Bst 2.0 و Br512 انجام شدند. واکنش‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه LightCycler 96 (Roche, Basel, Switzerland) اجرا شده و فلورسانس در کانال FAM ثبت شد. برای مقایسه عملکرد آنزیم‌ها، منحنی‌های ذوب نیز پس از اتمام واکنش ثبت گردید.



شکل ۲. مقایسه Br512 و Bst-LF در آزمایش‌های LAMP-OSD برای الگوهای DNA

جهش‌زایی هدفمند

جهش‌زایی در ژن Br512 با استفاده از کیت Q5 Site-Directed Mutagenesis (NEB, E0554S) و بر اساس پیشنهادهای MutCompute انجام شد. تمامی جهش‌های اعمال‌شده با تعیین توالی Sanger تأیید شدند.

آزمون پایداری حرارتی و سنجش عملکرد آنزیمی در دماهای بالا

جهت ارزیابی تحمل حرارتی واریانت‌های جهش‌یافته، آنزیم‌ها در دماهای ۷۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد قبل از انجام واکنش LAMP قرار گرفتند. میزان پایداری حرارتی آنزیم‌ها نیز با استفاده از آزمون انتقال حرارتی پروتئین (TSA) و معرف‌های Protein Thermal ShiftTM (Thermo Fisher, 4461146) اندازه‌گیری شد. سیگنال‌های فلورسانس در محدوده دمایی ۳۷ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ثبت و داده‌ها توسط نرم‌افزار LightCycler 96 تحلیل شدند (شکل ۲).

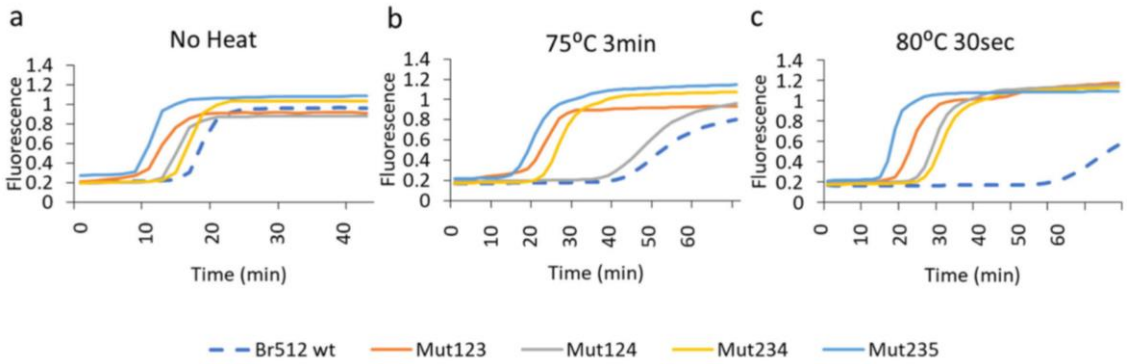
نتایج

افزودن یک دومـین پایدارکننده به Bst DNAP به‌عنوان مبنایی برای مهندسی آنزیم

جهت افزایش پایداری و عملکرد Bst DNAP، یک دومین سریع‌تاشونده از پروتئین villin (HP47) به انتهای N-ترمینال آنزیم متصل شد. نتایج نشان داد که این تغییر، نه‌تنها موجب افزایش پایداری حرارتی شد بلکه خالص‌سازی آنزیم را نیز تسهیل کرد. همچنین، بررسی‌های SDS-PAGE نشان داد که بیان و تخلیص این واریانت، میزان بازیابی پروتئین را در مقایسه با آنزیم والد افزایش داده است. این تغییرات موجب تولید ۳٫۵ برابری پروتئین خالص‌تر در مقایسه با Bst-LF شد که در آزمایش‌های عملکردی نیز عملکرد مناسبی از خود نشان داد.

ارزیابی عملکرد Br512 در واکنش‌های LAMP

عملکرد آنزیم مهندسی‌شده Br512 در واکنش‌های LAMP با روش OSD بررسی شد. نتایج نشان داد که این آنزیم عملکردی برابر یا بهتر از Bst-LF و Bst 2.0 دارد. در غلظت ۲۰ پیکومول، Br512 سرعت تکثیر مشابهی با Bst 2.0 نشان داد؛ درحالی‌که مقادیر پایین‌تر آنزیم موجب کاهش کارایی تکثیر شد. همچنین، مقایسه سیگنال‌های فلورسانس در حضور الگوهای مختلف DNA نشان داد که Br512 قادر است تکثیر هم‌دما را در زمانی کوتاه‌تر و با دقت بالاتر انجام دهد. تحلیل منحنی ذوب نیز نشان داد که محصولات ایجادشده توسط Br512 از نظر اختصاصیت با محصولات ایجادشده توسط Bst-LF یکسان هستند.



شکل ۳. تأثیر جهش‌های MutCompute بر پایداری حرارتی آنزیم Br512

پیش‌بینی جهش‌های پایدارکننده با استفاده از یادگیری ماشین

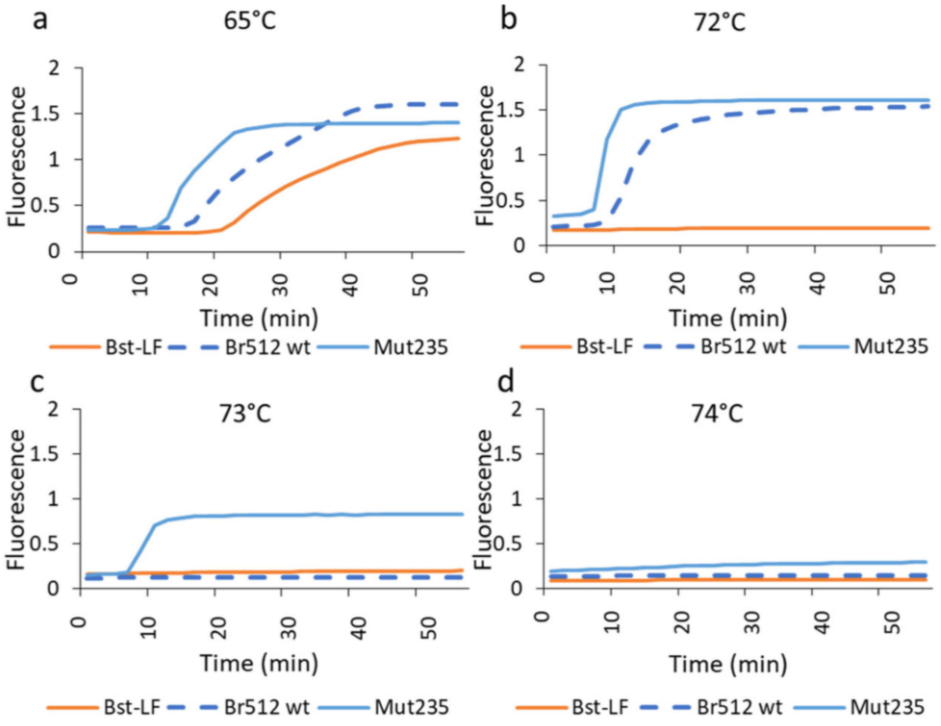
از الگوریتم MutCompute برای پیش‌بینی جهش‌های مطلوب جهت بهبود پایداری حرارتی آنزیم استفاده شد. این الگوریتم، موقعیت‌های مستعد جهش را بر اساس تحلیل محیط‌های میکروسکوپی شیمیایی هر اسیدآمینه تعیین کرد (Torng & Altman, 2017). از میان ۱۰ جهش پیشنهادی، پنج جهش (Mut1–Mut5) عملکرد مناسبی داشتند و در مراحل بعدی مورد بررسی قرار گرفتند. از میان این جهش‌ها، Mut2 و Mut3 بیشترین تحمل حرارتی را نشان دادند و بدین ترتیب برای ترکیب با سایر جهش‌ها انتخاب شدند (شکل ۳).

ترکیب جهش‌های منتخب برای افزایش پایداری حرارتی

با ترکیب جهش‌های منتخب، واریانت‌های جدیدی ایجاد شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنزیم Mut23، بهترین عملکرد را در آزمون‌های حرارتی از خود نشان داد. در مرحله بعد، چهار واریانت جهش‌یافته سه‌تایی (Mut123، Mut124، Mut234 و Mut235) ساخته شد. واریانت Mut235، بالاترین پایداری حرارتی را نشان داد و برای تحلیل‌های بیشتر انتخاب شد. در مقایسه با Br512، این واریانت جدید، دمای دناتوراسیون بالاتری (Tm = 78.1°C) نسبت به آنزیم والد (Tm = 75.5°C) داشت که با داده‌های به‌دست‌آمده از روش‌های TSA نیز تأیید شد.

عملکرد آنزیم‌های مهندسی‌شده در دماهای بالاتر

واکنش‌های LAMP با استفاده از واریانت‌های مهندسی‌شده در دماهای بالاتر (۷۲ تا ۷۴ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که Br512 می‌تواند واکنش را تا ۷۲ درجه سانتی‌گراد تحمل کند؛ درحالی‌که Mut235 توانست واکنش LAMP را تا دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد حفظ کند. بااین‌حال، Bst-LF و Bst 2.0 در این دما غیرفعال شدند. همچنین، آنالیز سرعت تکثیر نشان داد که واریانت‌های مهندسی‌شده موجب کاهش زمان واکنش تا ۱۰ دقیقه شدند که می‌تواند در بهبود کارایی تشخیص سریع بیماری‌های عفونی مؤثر باشد.



شکل ۴. آزمایش LAMP GAPDH در دمای بالا در ۷۲، ۷۳ و ۷۴ درجه سانتی‌گراد (a-d)

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، یک رویکرد ترکیبی شامل مهندسی پروتئین با استفاده از یک دومِین پایدارکننده و یادگیری ماشین به‌منظور بهینه‌سازی پایداری حرارتی Bst DNA پلیمراز ارائه شد. نتایج نشان داد که افزودن دومِین HP47 از پروتئین villin به Bst DNAP باعث بهبود پایداری و کارایی تکثیر این آنزیم شد. این اصلاح موجب افزایش پایداری حرارتی، تسهیل خالص‌سازی آنزیم و افزایش کارایی واکنش‌های LAMP گردید. علاوه بر این، استفاده از الگوریتم MutCompute برای پیش‌بینی جهش‌های پایدارکننده، منجر به طراحی واریانت‌هایی با دمای دناتوراسیون بالاتر (Tm = 78.1°C در مقایسه با ۷۵٫۵ درجه سانتی‌گراد در آنزیم والد) و کاهش زمان واکنش تا ۱۰ دقیقه شد (شکل ۴).

به‌طور خاص، واریانت Mut235 بالاترین میزان تحمل حرارتی را نشان داد و امکان اجرای واکنش LAMP را در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد فراهم کرد؛ درحالی‌که آنزیم‌های استاندارد مانند Bst 2.0 در این دما غیرفعال شدند. همچنین، آزمایش‌های حرارتی نشان دادند که جهش‌های پیشنهادی به‌صورت افزایشی عمل کرده و بهبود تدریجی را در پایداری و کارایی آنزیم ایجاد کرده‌اند.

این دستاوردها نشان می‌دهند که ترکیب روش‌های مهندسی پروتئین و یادگیری ماشین می‌تواند به طراحی آنزیم‌های بهینه‌سازی‌شده برای کاربردهای زیستی و تشخیصی کمک کند. بهبود پایداری حرارتی Bst DNAP، نه‌تنها می‌تواند موجب افزایش حساسیت و سرعت تشخیص در روش‌های LAMP شود بلکه زمینه را برای توسعه روش‌های تشخیصی مقرون‌به‌صرفه در محیط‌های کم‌منبع نیز فراهم می‌کند.

به‌طورکلی، این پژوهش، اولین نمونه از کاربرد یادگیری ماشین بدون نظارت برای بهینه‌سازی پایداری حرارتی یک DNA پلیمراز است. استراتژی ارائه‌شده، نه‌تنها محدود به Bst DNAP نیست بلکه می‌تواند برای مهندسی سایر آنزیم‌های صنعتی و زیستی نیز مورد استفاده قرار گیرد. این یافته‌ها، مسیر جدیدی را برای طراحی آنزیم‌های مقاوم به حرارت و با کارایی بالا در زیست‌فناوری، پزشکی و صنایع تشخیصی ارائه می‌دهد.

منابع

Aliotta, J. M., Pelletier, J. J., Ware, J. L., Moran, L. S., Benner, J. S., & Kong, H. (1996). Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3′ → 5′ proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, *12*(5), 185-195.

Coulther, T. A., Stern, H. R., & Beuning, P. J. (2019). Engineering polymerases for new functions. *Trends in Biotechnology*, *37*(10), 1091-1103.

Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. C., Xiong, D., Wu, W., Yu, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., Chang, H., Zhang, X., Wang, H., & Cui, Z. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*, *13*(4), 950-961.

Ma, Y., Zhang, B., Wang, M., Ou, Y., Wang, J., & Li, S. (2016). Enhancement of polymerase activity of the large fragment in DNA polymerase I from Geobacillus stearothermophilus by site-directed mutagenesis at the active site. *BioMed Research International*, 2016, 2906484.

Nikoomanzar, A., Chim, N., Yik, E. J., & Chaput, J. C. (2020). Engineering polymerases for applications in synthetic biology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *53*, e8.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, *28*(12), e63.

Park, G. S., Ku, K., Baek, S.-H., Kim, S. J., Kim, S. I., Kim, B. T., & Maeng, J.-S. (2020). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of Molecular Diagnostics*, *22*(6), 729-735.

Piotrowski, Y., Gurung, M. K., & Larsen, A. N. (2019). Characterization and engineering of a DNA polymerase reveals a single amino-acid substitution in the fingers subdomain to increase

strand-displacement activity of A-family prokaryotic DNA polymerases. *BMC Molecular and Cell Biology*, *20*(1), 31.

Sandalli, C., Singh, K., Modak, M. J., Ketkar, A., Canakci, S., Demir, İ., & Belduz, A. O. (2009). A new DNA polymerase I from Geobacillus caldoxylosilyticus TK4: Cloning, characterization, and mutational analysis of two aromatic residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(1), 105-117.

Shroff, R., Cole, A. W., Diaz, D. J., Morrow, B. R., Donnell, I., Annapareddy, A., Gollihar, J., Ellington, A. D., & Thyer, R. (2020). Discovery of novel gain-of-function mutations guided by structure-based deep learning. *ACS Synthetic Biology*, *9*(11), 2927-2935.

Torng, W., & Altman, R. B. (2017). 3D deep convolutional neural networks for amino acid environment similarity analysis. *BMC Bioinformatics*, *18*, 302.

استناد به این مقاله: رهبر، مرجان. (۱۴۰۳). بهبود پایداری حرارتی و عملکرد Bst DNA پلیمراز با ترکیب مهندسی پروتئین و یادگیری ماشین. *فصلنامه پژوهش‌های نوین در شهر هوشمند*، ۳(۲)، ۶۹-۷۶.

New Researches in The Smart City is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.