

## بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز و سنجش ATP سلولی

مجتبی مرتضوی، سامان حسینخانی\*، رحمان امامزاده  
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: بهمن ۸۶ بازبینی: خرداد ۸۷ پذیرش: خرداد ۸۷

### چکیده

**مقدمه:** لوسیفراز آنزیم کلیدی نشر نور در موجودات نورافشان می باشد. این آنزیم واکنش نشر نور را با استفاده از سوبستراهای لوسیفیرین و ATP انجام می دهد. در این مطالعه، بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز از حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* و راه اندازی سنجش ATP سلولی انجام شد.

**روش ها:** cDNA کدکننده لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* از ناقل pQE30 به ناقل بیانی pET28a منتقل و ناقل نوترکیب بیانی pLtu28a ساخته شد. این ناقل در باکتری *E. coli* سویه XL1Blue بیان و تخلیص لوسیفراز نوترکیب با استفاده از ستون نیکل سفارژ و در یک مرحله انجام شد. فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر بررسی و مقدار Km و Vmax آنزیم نسبت به ATP اندازه گیری گردید. با استفاده از کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز و سریال رقت از ATP، یک منحنی استاندارد رسم شد. سپس به کمک محیط کشت حاوی باکتری، منحنی سنجش غلظت باکتری ها برای کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده رسم گردید.

**یافته ها:** نتایج این پژوهش نشان میدهد که انتقال cDNA کدکننده لوسیفراز *L. turkestanicus* به داخل وکتور pET28 و ترانسفورم کردن آن به درون باکتری های مستعد به طور کامل انجام شده است. پس از رشد باکتری های نوترکیب، کلونی های مثبت به سهولت و به کمک لوسیفیرین انتخاب و کشت داده شد. تصویر ژل SDS-PAGE نشان می دهد که تخلیص آنزیم لوسیفراز به کمک رزین نیکل سفاروز با خلوص بالایی انجام شده است. منحنی های استاندارد سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری ها با استفاده از کیت شرکت پرومگا و کیت طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز نشان دهنده همسانی بالای این دو روش در تشخیص میزان ATP می باشند.

**نتیجه گیری:** مطالعه منحنی های حاصل از سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری ها در مورد کیت پرومگا با کیت طراحی شده نشان دهنده کیفیت بالای کیت طراحی شده و قابلیت آن در سنجش ATP و استفاده های دیگر از این کیت را تایید می کند.

واژه های کلیدی: بیولومینسانس، لوسیفراز، *Lampyris turkestanicus*، ATP

### مقدمه

شبتاب (Firefly) و لوسیفراز باکتریایی شناخته شده ترین لوسیفرازها می باشند و از لحاظ نوع سوبسترا و مکانیسم عمل با یکدیگر متفاوت هستند.

لوسیفراز حشره ی شبتاب (Firefly) دو مرحله آنزیمی اساسی را برای بیولومینسانس کاتالیز می کند. در مرحله اول لوسیفراز فعال شدن D-لوسیفیرین طی آدنیلاسیون گروه کربوکسیل توسط  $Mg^{2+}$  ATP را کاتالیز می کند و در مرحله دوم، لوسیفراز به عنوان یک اکسیژناز عمل می کند و با اکسیداسیون آدنیل - لوسیفیرین تشکیل یک حد واسط دی اکسی

بیولومینسانس (BL) یا نشر نور توسط موجودات زنده از پدیده های جالب توجه در علوم زیستی می باشد. این فرایند در دسته وسیعی از موجودات خشکی زی و آبی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم های کلیدی کاتالیز کننده این دسته از واکنشها، با نام عمومی لوسیفراز شناخته می شوند. لوسیفراز حشره ای

saman\_h@modares.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله: